



Universidade de
Aveiro

Departamento de Química

2015

**Cátia Andreia Alves
Almeida**

**Estudo do comportamento fermentativo de
Actinobacillus succinogenes para a produção de
ácido succínico e ácido láctico**



**Cátia Andreia Alves
Almeida**

**Estudo do comportamento fermentativo de
Actinobacillus succinogenes para a produção de
ácido succínico e ácido láctico**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Engenheiro Alexandre Miguel Ricardo Gaspar do Instituto de Investigação da Floresta e Papel - RAIZ.

O júri

Presidente

Doutora Mara Guadalupe Freire Martins

Investigadora Coordenadora do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier

Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutor Flávio Gonzaga Castro Santos Silva

Investigador Pós-Doc no Centro de Estudos do Ambiente e do Mar do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

À Professora Doutora Ana Xavier agradeço a proposta do tema de trabalho, a orientação científica, a disponibilidade, a preocupação e o apoio demonstrados durante a realização deste trabalho.

Agradeço ao Engenheiro Alexandre Gaspar, do Instituto de Investigação da Floresta e do Papel – RAIZ, pela oportunidade de integração num projeto industrial, pela disponibilidade e pela transmissão de conhecimento sobre todo o processo de produção industrial de pasta e papel.

Ao Instituto de Investigação da Floresta e do Papel – RAIZ agradeço pelo fornecimento de pasta de papel, solução enzimática e todo o equipamento necessário para a realização das hidrólises enzimáticas. Um especial agradecimento à Patrícia Figueiredo pela transmissão de conhecimentos, pelo acompanhamento na realização das hidrólises enzimáticas e por todo o apoio e carinho demonstrados.

A todas as pessoas do LEB (29.1.16) agradeço a amizade, o apoio, a partilha de problemas, de preocupações, de conhecimentos e essencialmente de bons momentos. Agradeço especialmente à Doutora Susana Pereira pela supervisão, pela ajuda na resolução de problemas, pela preocupação e pelas palavras amigas e reconfortantes.

Agradeço à Catarina Rangel, ao Lucas França, ao Tiago Henriques, à Raquel Fernandes, à Diana Cabecinhas, à Adriana Sousa e à Valéria Monteiro pela amizade ao longo desta caminhada.

Aos meus pais e aos meus irmãos, agradeço o carinho, a confiança e o incentivo que sempre demonstraram. E, finalmente um agradecimento especial ao Fábio que embora seja contabilista, forçosamente se tornou um pouco biotecnólogo!

Palavras-chave

Actinobacillus succinogenes, anaerobiose, ácido succínico, ácido láctico, PBS, PLA, pasta de papel

Resumo

A pasta de papel, produto da indústria papelreira, é constituída por polissacarídeos, essencialmente celulose e hemiceluloses. Através da ação de enzimas hidrolíticas é possível converter estes polímeros em monómeros de glucose e xilose, permitindo assim obter um hidrolisado com elevadas concentrações de açúcares e sem inibidores. Estes açúcares podem ser utilizados por diferentes microrganismos para a produção de biocombustíveis ou outros bioprodutos de elevado valor acrescentado.

Actinobacillus succinogenes é uma bactéria classificada como anaeróbia facultativa capaz de crescer em meios ricos em CO₂, incorporando esta fonte de carbono nos seus metabolismos para produzir metabolitos de valor acrescentado como o ácido succínico (AS). Dependendo das condições de cultura, *A. succinogenes* pode produzir elevadas concentrações de AS ou de ácido láctico (AL), neste caso não incorporando CO₂, sendo que por vezes ocorre a coprodução de outros ácidos orgânicos como o ácido fórmico e o ácido acético. O AS e o AL podem polimerizar e dar origem a poli butileno succinato (PBS) e poli ácido láctico (PLA), respetivamente, polímeros com elevado interesse industrial devido às suas características de biodegradabilidade e biocompatibilidade.

O objetivo deste trabalho foi estudar a produção de AS e AL por *A. succinogenes* em diferentes sistemas fermentativos, utilizando glucose como substrato. O melhor ensaio obtido foi repetido utilizando hidrolisado como matéria-prima.

Em termos de produção de AS, os melhores resultados foram conseguidos num ensaio realizado em Erlenmeyer, com 50 g/L de glucose, tendo sido obtidos 13,6g AS/L, o que se traduziu num rendimento de 0,646 g AS/g Glc. Este ensaio foi reproduzido em biorreator, com controlo de pH, em modo *batch*, alcançando-se um rendimento de 0,444 g AS/g Glc.

A produção de AL foi realizada em biorreator, com controlo de pH, em modo *fed-batch* com uma concentração inicial de glucose de 20 g/L, tendo sido fornecido, no decorrer do ensaio, um pulso de alimentação com a mesma concentração de glucose. Desta forma foram produzidos 25,3 g AL/L o que originou um rendimento de 0,794 g AL/g Glc. Este ensaio foi novamente realizado com hidrolisado o que permitiu obter um rendimento de 0,898 g AL/g Glc. Através deste ensaio verificou-se que *A. succinogenes* demonstra elevada capacidade de adaptação ao hidrolisado, o que permitiu a obtenção de um rendimento de produção de ácido láctico elevado.

Keywords

Actinobacillus succinogenes, anaerobiosis, succinic acid, lactic acid, PBS, PLA, paper pulp

Abstract

Paper pulp, a product of the pulp and paper industry, is composed by polysaccharides, which are mainly cellulose and hemicelluloses. Through the action of hydrolytic enzymes it is possible to convert these polymers into monomers of glucose and xylose, thereby producing a hydrolysate with high sugar concentration and without any inhibitors. These sugars can be consumed by many microorganisms to produce biofuels or other high value bioproducts.

Actinobacillus succinogenes is a facultative anaerobic bacterium able to grow with high CO₂ concentrations, incorporating this carbon source into its metabolism to produce high value metabolites as it is the case of succinic acid (SA). Depending on the culture conditions, *A. succinogenes* can produce high concentrations of succinic acid (SA) or lactic acid (LA) in this case without CO₂ incorporation, together with the co-production of other organic acids such as formic acid and acetic acid. SA and LA can be polymerized originating poly(butylene succinate) (PBS) and poly(lactic acid) (PLA), respectively. These polymers have high industrial interest due to their biodegradability and biocompatibility characteristics.

The purpose of this work was to study the production of SA and LA by *A. succinogenes* in different fermentative systems, using glucose as substrate. The best essay was repeat using hydrolysate as feedstock.

In terms of SA production, the best results were obtained in a test performed in Erlenmeyer with 50 g/L of glucose, where 13.6 g_{AS}/L have been produced, which resulted in a yield of 0.646 g_{AS}/g_{Glc}. This essay was reproduced in biorreator, with pH control, in batch operation, reaching a yield of 0.444 g_{AS}/g_{Glc}.

The LA production was performed in a biorreator with pH control, operated in fed-batch mode and using a initial glucose concentration of 20 g/L. During the essay a pulse with the same glucose concentration was supplied. This way where 25.3 g_{AL}/L have been produced which resulted in a yield of 0.794 g_{AL}/g_{Glc}. This essay was performed again with hydrolysate which allowed to obtain a yield of 0.898 g_{AL}/g_{Glc}. Through this test it was verified that *A. succinogenes* presents a high adaptability to the hydrolysate, which allowed to obtain a high acid lactic production yield.

Índice

Capítulo 1- Revisão bibliográfica	1
1.1 Biorrefinarias	1
1.1.1 A madeira	2
a) A celulose.....	2
b) As hemiceluloses	3
c) A lenhina	4
d) Os extratáveis.....	5
1.1.2 Processos de produção de pasta de papel	5
a) Obtenção de açúcares fermentáveis a partir de pasta crua.....	8
1.2 <i>Actinobacillus succinogenes</i>	11
1.3 Ácido succínico.....	12
1.3.1 Produção industrial de ácido succínico	14
1.3.2 Microrganismos produtores de ácido succínico	15
1.4 Ácido lático	19
1.4.1 Produção industrial de ácido lático	20
1.4.2 Microrganismos produtores de ácido lático	21
1.5 Objetivos	26
Capítulo 2 - Materiais e Métodos	27
2.1 Matéria-prima	27
2.1.1 Caracterização da pasta <i>Kraft</i> crua.....	27
2.1.2 Hidrólise enzimática da pasta <i>Kraft</i> crua	27
2.2 Microrganismo	29
2.3 Meios de cultura.....	29
2.4 Ensaio em frascos encapsulados e Erlenmeyers	31
2.4.1 Preparação do inóculo	31
2.4.2 Fermentações anaeróbias	31
2.5 Ensaio em biorreator	32

2.5.1	Preparação do inóculo	32
2.5.2	Fermentações em biorreator	33
2.6	Métodos analíticos	35
2.6.1	Quantificação da biomassa.....	35
2.6.2	Determinação de açúcares e ácidos por HPLC	35
2.6.3	Análises de cromatografia GC-MS	36
2.6.4	Análises de Ressonância Magnética Nuclear, RMN	36
2.7	Método de cálculo dos parâmetros fermentativos	37
Capítulo 3 - Resultados e discussão.....		39
3.1	Hidrólise enzimática da pasta <i>Kraft</i> crua	39
3.2	Preparação dos inóculos: influência no crescimento	41
3.3	Produção de ácido succínico através de <i>A. succinogenes</i>	42
3.3.1	Meio de crescimento Vs. Meio de fermentação.....	42
3.3.2	Comparação de ensaios realizados em diferentes sistemas fermentativos	44
3.4	Produção de ácido láctico através de <i>A. succinogenes</i>	49
a)	Análises de GC-MS e RMN: confirmação da produção de ácido láctico	50
3.4.1	Estudo da influência de diferentes concentrações iniciais de glucose .	53
3.4.2	Ensaio <i>fed-batch</i> contendo 20 g/L de glucose	57
3.4.3	Ensaio <i>fed-batch</i> com 20 g/L de hidrolisado	59
a)	Comparação do comportamento fermentativo de <i>A. succinogenes</i> com diferentes fontes de açúcar: glucose vs. hidrolisado.....	60
3.4.4	Outros estudos em que foi produzido ácido láctico através de <i>A. succinogenes</i> : comparação com os resultados obtidos	62
4.	Conclusão.....	65
5.	Trabalho futuro	67
6.	Bibliografia	69
Anexos		75

1.	Cálculos para a realização dos ensaios de hidrólise enzimática das pastas	
<i>Kraft</i>	75
2.	Realização da curva de calibração Concentração da biomassa (g/L) vs.	
Absorvância (660 nm)	76
3.	Curvas de calibração referentes à análise de HPLC	78

Índice de Figuras

Figura 1. Estrutura parcial de uma cadeia de celulose, em que o N representa uma unidade de celobiose.....	2
Figura 2. Representação das pontes de hidrogénio intramoleculares (2→6) e intermoleculares (3→6) em duas cadeias de celulose.....	3
Figura 3. Representação da estrutura das hemiceluloses mais abundantes em angiospérmicas e gimnospérmicas..	4
Figura 4. Estrutura química dos precursores da lenhina. 1-álcool p-cumarílico, 2-álcool coniferílico e 3- álcool sinapílico.....	5
Figura 5. Processos de produção de pasta e de papel..	7
Figura 6. Representação esquemática do processo completo de hidrólise enzimática da celulose.	10
Figura 7. Esquema simplificado das vias metabólicas de <i>A. succinogenes</i>	11
Figura 8. Estrutura química do ácido succínico.....	12
Figura 10. Esquema geral da produção de PBS através de ácido succínico e 1,4-butanodiol. (a): reação de esterificação; (b): reação de transesterificação.	13
Figura 9. Reação de conversão do ácido succínico em 1,4- butanodiol.	13
Figura 11. Evolução da produção de ácido succínico a nível mundial, em toneladas métricas por ano.....	14
Figura 12. Esquema do metabolismo de produção de ácido succínico (plataforma C ₄) e de outros ácidos da plataforma C ₃ por <i>A. succinogenes</i>	15
Figura 13. Estrutura dos enanteómeros L e D de ácido láctico.	19
Figura 14. Esquema das diferentes formas de produção de PLA.	20
Figura 15. Esquema do metabolismo de produção de ácido láctico por <i>A. succinogenes</i>	23
Figura 16. Massa de pasta <i>Kraft</i> crua pesada e adicionada ao copo onde ocorreu a hidrólise	28
Figura 17. Aspeto do hidrolisado após filtração.	28
Figura 18. Crescimento de <i>A. succinogenes</i> em meio TSB sólido.	31
Figura 19. Imagens referentes a fermentações realizadas em frasco encapsulado e em Erlenmeyer, respetivamente.	32
Figura 20. Biorreator em funcionamento.....	33

Figura 21. Evolução do pH e da temperatura ao longo das hidrólises.	39
Figura 22. Aspeto do hidrolisado após esterilização e consequente formação de precipitado.	40
Figura 23. Evolução do crescimento de <i>A. succinogenes</i> em MF com diferentes tipos de inóculos: a partir de cultura líquida (CL), cultura <i>stock</i> glicerol (CG) e colónias em meio sólido (CS).....	41
Figura 24. Evolução da fermentação em frasco encapsulado contendo 80 mL de MF	45
Figura 25. Evolução da fermentação realizada em Erlenmeyer com 300 mL de MF	46
Figura 26. Evolução da fermentação realizada em biorreator utilizando 800 mL de MF com pH controlado a 6,8 através da adição de NaOH.	47
Figura 27. Espectros obtidos após análise de GC-MS de uma amostra contendo o composto produzido	50
Figura 29. A: Espectro de massa experimental referente ao pico que se encontra aos 6,26 minutos e respetivo espectro de massa teórico (B)	51
Figura 28. Espectro de massa referente ao pico que se encontra aos 3,41 minutos ..	51
Figura 30. Espectro ^1H RMN obtido para uma amostra de MF	52
Figura 31. Espectro ^1H RMN obtido para a amostra de fermentado.....	52
Figura 32. Fermentação realizada em frasco encapsulado contendo 10 g/L de glucose.....	53
Figura 33. Fermentação realizada em frasco encapsulado contendo 20 g/L de glucose.....	54
Figura 34. Fermentação realizada em frasco encapsulado contendo 30 g/L de glucose.....	55
Figura 35. Ensaio realizado em biorreator, em modo <i>fed-batch</i> com aproximadamente 20 g/L de glucose e pH controlado a 6,8 pela adição de NaOH. A linha vertical que se encontra próximo das 50 h representa a adição de um pulso de alimentação.	57
Figura 36. Perfil de concentrações da fermentação realizada em biorreator em modo <i>fed-batch</i> , com 20 g/L de hidrolisado e pH controlado a 6,8 através da adição de NaOH. A	

linha vertical que se encontra próxima das 28,0 h corresponde a um pulso de alimentação.

.....	59
Figura 37. Representação da relação linear entre a concentração de biomassa (g/L) e a absorvância a 660 nm.....	78
Figura 38. Curva de calibração Área vs. Glucose (g/L)	79
Figura 39. Curva de calibração Área vs. Xilose (g/L)	79
Figura 40. Curva de calibração Área vs. Ácido succínico (g/L).....	80
Figura 41. Curva de calibração Área vs. Ácido fórmico (g/L)	80
Figura 42. Curva de calibração Área vs. Ácido acético (g/L)	81
Figura 43. Curva de calibração Área vs. Ácido láctico (g/L).....	81

Índice de Tabelas

Tabela 1. Composição da madeira da espécie <i>E. globulus</i>	6
Tabela 2. Estudos referentes à produção de ácido succínico, AS, através de <i>A. succinogenes</i>	18
Tabela 3. Estudos referentes à produção de ácido láctico, AL, através de <i>A. succinogenes</i>	24
Tabela 4. Caracterização detalhada da pasta <i>Kraft</i> crua.	27
Tabela 5. Composição dos meios de ativação sólido e líquido	30
Tabela 6. Composição do meios de crescimento (MC) e do meio de fermentação (MF).....	30
Tabela 7. Resumo de todos os ensaios realizados	34
Tabela 8. Resultados obtidos em fermentações realizadas em meio de crescimento (MC) e meio de fermentação (MF).....	43
Tabela 9. Comparação entre fermentações realizadas por <i>A. succinogenes</i> , utilizando diferentes sistemas fermentativos	48
Tabela 10. Parâmetros cinéticos correspondentes a ensaios com diferentes concentrações de glucose.....	56
Tabela 11. Comparação dos parâmetros cinéticos referentes aos ensaios <i>fed-batch</i> com diferentes fontes de açúcar.....	61
Tabela 12. Parâmetros cinéticos referentes a ensaios realizados e a outros estudos já publicados.....	62
Tabela 13. Massas dos tubos Falcon, dos tubos Falcon com a biomassa (X) e da biomassa em cada réplica	76
Tabela 14. Concentração da biomassa (X) em cada uma das réplicas e respetivo valor médio	77
Tabela 15. Relação entre a biomassa (g/L) e a Absorvância a 660 nm	77

Nomenclatura

μ_{\max}	Taxa específica de crescimento máxima (h^{-1})
$^1\text{H RMN}$	Acoplamento de prótons em Ressonância Magnética Nuclear
AA	Ácido acético
ADP	Adenosina difosfato
AF	Ácido fórmico
AL	Ácido lático
AS	Ácido succínico
ATP	Adenosina trifosfato
CG	Cultura <i>stock</i> glicerol
CHC	Concentração de hidratos de carbono (g/L)
CL	Cultura líquida
CS	Colónias crescidas em meio sólido
GC-MS	<i>Gas Chromatography - Mass Spectrometry</i>
Glc	Glucose
H	Humidade (%)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
MC	Meio de crescimento
MF	Meio de fermentação
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
P	Taxa volumétrica de produção (g/L.h)
PBS	Poli butileno succinato
PEP	Fosfoenol piruvato
pKa	Constante de dissociação ácida
PLA	Poli ácido lático
r Glc	Taxa volumétrica de consumo de glucose (g Glc/L.h)
T	Tempo (h)
TSB	<i>Tryptone soy broth</i>
V _E	Volume de enzima (mL)

V_{SE}	Volume de solução enzimática (mL)
X	Biomassa (g/L)
Y	Rendimento (g produto/g substrato)
δ	Desvio químico (ppm)

Introdução

A sociedade atual está extremamente dependente dos recursos fósseis para a produção de combustíveis, produtos químicos e materiais. A utilização destes recursos tem causado inúmeros problemas a nível ambiental, económico e geopolítico, e por isso, tem-se verificado um enorme interesse em desenvolver e otimizar processos que permitam a produção dos mesmos produtos que são obtidos através dos recursos fósseis, mas utilizando biomassa como matéria-prima. Os materiais lenhocelulósicos são a biomassa renovável mais abundante na Terra. No entanto, o facto deste tipo de matéria-prima ser estruturalmente complexa constitui uma desvantagem aquando da sua utilização, sendo necessário realizar previamente processos que permitam a separação dos diferentes constituintes - celulose, hemiceluloses e lenhina [1]–[3]. A indústria papelreira é um setor muito importante em Portugal, destacando-se pela capacidade de produzir elevadas quantidades de pasta, papel e energia [4]. Após o cozimento da madeira pelo processo *Kraft*, obtém-se pasta com elevada percentagem de celulose, contendo também algumas hemiceluloses e vestígios de lenhina [5]. A celulose é um homopolímero constituído por unidades de D-glucose que, através da ação de enzimas hidrolíticas, como as celulasas, pode ser convertida em oligómeros ou monómeros de glucose [6]. Posteriormente estes açúcares podem ser biologicamente transformados em diversos produtos de elevado valor acrescentado, resultantes de fermentações.

O ácido succínico é atualmente considerado um *building block* químico, base da plataforma de 4 carbonos, C₄, e com grande potencial para a produção de biopolímeros como o poli butileno succinato (PBS) [7], [8]. Tradicionalmente este ácido é produzido recorrendo aos recursos fósseis, no entanto, têm-se desenvolvido processos de produção biológica de ácido succínico recorrendo especialmente a bactérias [9], [10]. *Actinobacillus succinogenes* é uma das bactérias que demonstra capacidade de produção de elevadas concentrações de ácido succínico [11]. Por outro lado esta bactéria, com diferentes condições de processo produz ácido láctico, que depois de polimerizado origina um biopolímero, o poli ácido láctico (PLA) [12], [13].

O objetivo deste trabalho foi o estudo do comportamento fermentativo de *A. succinogenes*, para a produção de ácido succínico e também para a produção de ácido láctico. O melhor ensaio obtido foi repetido utilizando hidrolisado de pasta *Kraft* crua como fonte de açúcar.

Capítulo 1- Revisão bibliográfica

1.1 Biorrefinarias

Atualmente, a nível mundial, os recursos fósseis – carvão, petróleo e gás natural - são a principal fonte de energia e as matérias-primas de base para a produção de combustíveis, produtos químicos e materiais. Estes são continuamente usados e a sua procura é constante devido ao aumento da população e da industrialização dos países em desenvolvimento. Os recursos fósseis são esgotáveis, além disso, apenas se encontram disponíveis em determinadas regiões do mundo, sendo que a sua utilização tem causado inúmeros e irreparáveis problemas a nível ambiental, como o aumento da libertação de gases com efeito de estufa. Além dos problemas ambientais, verifica-se também que a utilização destes recursos se torna problemática devido a questões económicas e geopolíticas [1]. Pelos motivos já enumerados tornou-se necessário encontrar alternativas que permitam a produção de combustíveis, produtos químicos e materiais, de forma sustentável e responsável, social e ambientalmente, de modo a colmatar as exigências crescentes da população [14].

A utilização de biomassa como matéria-prima, representa inúmeras vantagens, uma vez que a biomassa é renovável e biodegradável, permite uma produção sustentável, apresenta uma melhor distribuição geográfica, possibilitando o desenvolvimento regional, e a sua utilização contribui para a redução da emissão de gases com efeito de estufa [15], [16]. Deste modo surge o conceito de biorrefinaria, associado à utilização de biomassa como matéria-prima para a produção de produtos equivalentes aos que neste momento são obtidos numa refinaria petrolífera, combustíveis, produtos químicos e materiais, recorrendo a processos de conversão químicos e/ou biológicos [17]. Em termos de abundância de biomassa os recursos lenhocelulósicos são a matéria-prima renovável mais abundante na Terra. Entre os materiais considerados lenhocelulósicos encontram-se os resíduos florestais (resíduos resultantes da limpeza da floresta como troncos, ramos de árvores ou arbustos), resíduos resultantes da atividade agrícola (resíduos de cana de açúcar, palha de milho) e subprodutos de atividades industriais (engaço de uva, licores e pastas celulósicas) [1]–[3], [18]. A biomassa vegetal é extremamente complexa e por isso tem de ser previamente processada, de forma a que ocorra separação dos seus diferentes constituintes para que

Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica

possam posteriormente ser processados de forma a serem obtidos produtos de elevado valor acrescentado [19].

Um setor que tira partido dos recursos lenhocelulósicos, em Portugal, é a indústria papelreira, que produz pasta, papel e energia através da madeira, utilizando essencialmente troncos de *Eucalyptus globulus* de forma a garantir a qualidade da pasta e do papel [20].

Atualmente, a nível mundial já há várias empresas que funcionam como biorrefinarias sustentáveis, exemplo disso é a Borregaard que tem a capacidade de produzir etanol e diversos produtos químicos, utilizando a madeira e os seus subprodutos como matéria-prima [21].

1.1.1 A madeira

A composição química de determinada espécie de árvore pode variar ligeiramente, uma vez que há diversos fatores que influenciam a biossíntese dos tecidos, entre eles a localização geográfica, a idade, as características do solo como a disponibilidade e a diversidade de nutrientes. Independentemente das diferenças na constituição, a madeira é um tecido biológico altamente organizado a nível celular e molecular com uma ultra-estrutura própria e singular [22]. Para além da celulose, hemiceluloses e lenhina contém também, baixas quantidades de extratáveis e de substâncias inorgânicas. A parede celular é maioritariamente constituída por açúcares, que constituem a celulose e as hemiceluloses, perfazendo uma percentagem de hidratos de carbono entre 65-75% [23], [24].

a) A celulose

A celulose é o composto químico mais abundante na Terra, sendo o constituinte maioritário da madeira, representando aproximadamente 50% da sua massa seca [25].

A celulose é um polissacarídeo constituído por unidades de D-glucose unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$, constituindo assim um homopolímero linear, como se representa na Figura 1. A celobiose é a unidade básica de formação da celulose e representa um dímero de D-glucopirranose.

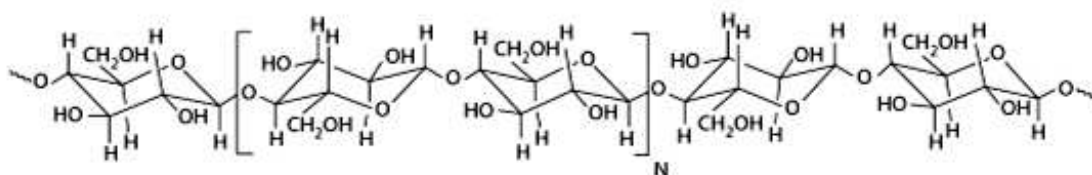


Figura 1. Estrutura parcial de uma cadeia de celulose, em que o N representa uma unidade de celobiose. Adaptado de [5].

A celulose é organizada em microfibrilas, estas não têm uma orientação definida, no entanto, têm tendência a formar pontes de hidrogénio intramoleculares e intermoleculares, como se pode verificar na Figura 2. As pontes de hidrogénio intramoleculares concedem rigidez à cadeia, enquanto que as intermoleculares são responsáveis pela formação de agregados supramoleculares com domínios cristalinos designados por fibrilas. Assim, podem diferenciar-se duas regiões na celulose, as zonas cristalinas, que são aquelas onde se verifica agregação dos domínios e as zonas amorfas que são as que têm os domínios pouco organizados. Quanto mais cristalina for a estrutura, mais difícil é a sua hidrólise, no entanto, a celulose pode ser degradada por ácidos e enzimas designadas de celulasas, originando monómeros ou oligómeros de glucose [25].

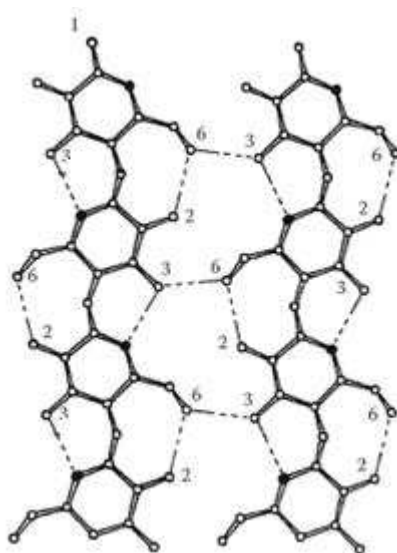


Figura 2. Representação das pontes de hidrogénio intramoleculares (2→6) e intermoleculares (3→6) em duas cadeias de celulose. Adaptado de [23].

b) As hemiceluloses

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos ramificados, constituídos por diferentes tipos de açúcares monoméricos. Esses açúcares podem ser pentoses como xilose e arabinose; hexoses como glucose e manose; ácidos urónicos como o ácido glucurónico e desoxihexoses como a ramnose [24]. A cadeia principal consiste em repetições de açúcares ligados por ligações β (1→4), enquanto que nas ramificações podem ocorrer ligações α (1→2), α (1→3) e α (1→6) [23].

Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica

As hemiceluloses têm uma estrutura hidrofílica que funciona como ligação entre a celulose e a lenhina, regulando a sua distribuição [25]. Encontram-se na madeira numa percentagem variável entre 10-40% e, juntamente com a celulose são as maiores fontes de açúcares presentes nos materiais lenhocelulósicos [2].

As árvores do tipo angiospérmicas e gimnospérmicas têm diferente composição, no que diz respeito às hemiceluloses. As hemiceluloses que compõem a madeira do tipo gimnospérmica são maioritariamente constituídas por hexoses, das quais se destacam as galactoglucomananas. A madeira do tipo angiospérmica contém hemiceluloses que são essencialmente constituídas por pentoses, apesar de também conterem algumas hexoses, embora em menor percentagem, como é o caso das glucuronoxilanas (

Figura 3) [26].

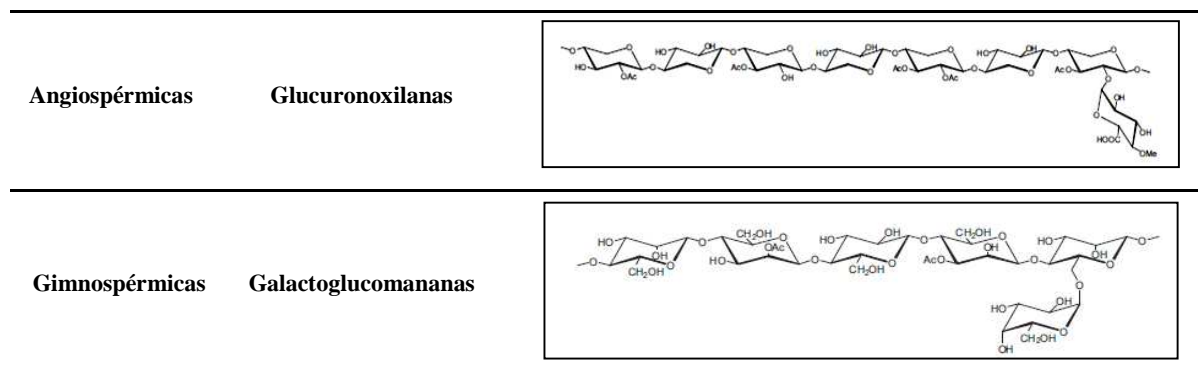


Figura 3. Representação da estrutura das hemiceluloses mais abundantes em angiospérmicas e gimnospérmicas. Adaptado de [26].

c) A lenhina

A lenhina é o segundo maior constituinte da parede celular das plantas. As diferentes espécies de madeira contêm lenhina numa percentagem variável entre 20-40% [24]. A lenhina constitui a fração não-polissacarídica da parede celular e é um composto altamente complexo. É um polímero amorfo, constituído por unidades de fenilpropano, que derivam da polimerização do álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (Figura 4). As três unidades básicas estão ligadas por ligações éter e/ou ligações carbono-carbono [23].

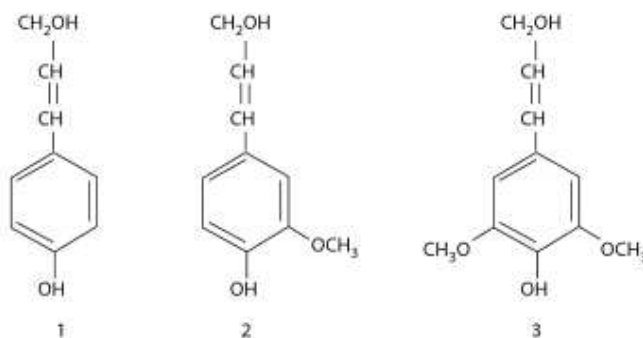


Figura 4. Estrutura química dos precursores da lenhina. 1-álcool p-cumarílico, 2-álcool coníferílico e 3-álcool sinapílico. Adaptado de [23].

Juntamente com as hemiceluloses, a lenhina forma uma matriz amorfa na qual estão embebidas as microfibrilas de celulose sendo esta matriz amorfa a base que liga as células. Esta associação entre a celulose, as hemiceluloses e a lenhina faz com que a parede celular das árvores se torne extremamente resistente à degradação mecânica e biológica [25].

d) Os extratáveis

A madeira contém um elevado número de compostos orgânicos de baixo peso molecular designados de extratáveis [23].

Os diferentes tipos de extratáveis desempenham importantes funções biológicas. Os ácidos gordos constituem uma fonte de energia para as células; os terpenóides, as resinas ácidas e as substâncias fenólicas protegem as células dos ataques microbianos ou de insetos enquanto que alguns iões metálicos são utilizados como cofatores enzimáticos [27]. A percentagem de extratáveis presentes na madeira varia entre 2-5%, dependendo do tecido da árvore que se está a analisar. Além disso, a composição dos extratáveis varia consideravelmente entre as famílias de árvores, consoante a região geográfica e a estação do ano[24], [26].

1.1.2 Processos de produção de pasta de papel

A madeira é a matéria-prima e por isso o ponto de partida para a produção de pasta e papel. A escolha da espécie de árvore a utilizar é determinante, uma vez que, como diferentes espécies têm diferente composição, isso vai repercutir-se nas características da pasta e do papel [26].

Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica

A madeira da espécie *E. globulus* foi utilizada pela primeira vez em Portugal para o fabrico de pasta e papel. O rápido crescimento das árvores e o facto da madeira de *E. globulus* originar pastas com boas características e que podem ser utilizadas em diversas aplicações, fez com que o interesse por esta espécie aumentasse. Embora não tenha muitas necessidades a nível nutricional, *E. globulus* exige climas temperados e por isso não é abundante em alguns países da Europa [28], [29]. Nos últimos estudos realizados verificou-se que em Portugal 26 % da área florestal está ocupada pela espécie *E. globulus*, o que representa cerca de 812 mil hectares [30]. Grande parte desta madeira é utilizada pela indústria papelreira, sendo que, cerca de 90 % da produção portuguesa de pasta de papel de *E. globulus* é exportada [31]. A composição da madeira da espécie *E. globulus* encontra-se na Tabela 1 [27].

Tabela 1. Composição da madeira da espécie *E. globulus* [27]

Espécie	Lenhina (%)	Celulose (%)	Glucuronoxilanas (%)
<i>E. globulus</i>	21,9	51,3	19,9

Após a seleção da espécie de madeira a utilizar, esta é cortada em aparas que são sujeitas a processos que promovem a sua digestibilidade. Nestes processos o objetivo é separar das fibras da madeira celulose e hemiceluloses, a lenhina e os extratáveis para prosseguir para a produção de pasta e papel. Estes processos dividem-se em mecânicos, químicos e mistos (químico-mecânicos) (Figura 5) [32]. Nos processos mecânicos a madeira é sujeita a pressões e temperaturas elevadas que provocam a quebra das pontes de hidrogénio, permitindo assim a separação das fibras da madeira. É através deste tipo de processos que se obtêm rendimentos de separação das fibras mais elevados, alcançando-se valores compreendidos entre 90-96%. Apesar dos elevados valores de rendimento obtidos nos processos mecânicos, estes provocam a degradação de fibras de hemiceluloses e de celulose o que faz com que as pastas obtidas tenham baixa capacidade de resistência, sendo isso refletido nas características do papel produzido. Além disso, a lenhina é apenas degradada, não sendo removida, provocando assim a libertação de alguns tipos de impurezas para as pastas [24], [33].

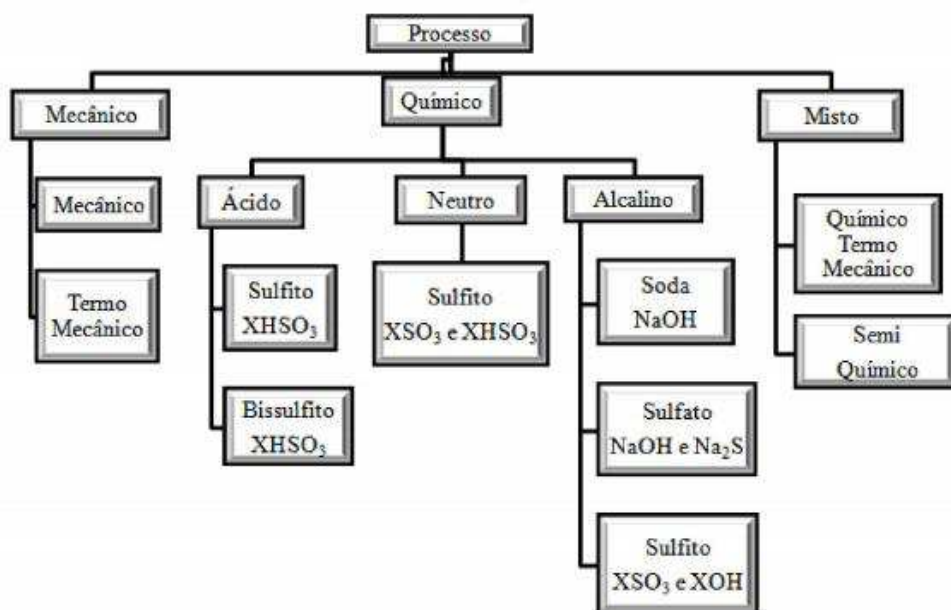


Figura 5. Processos de produção de pasta e de papel. Retirado de [73].

Os processos mistos alcançam um rendimento de 85-90%, enquanto que os processos químicos são aqueles onde se consegue um rendimento mais baixo, de 43-52% [33]. Nos processos químicos a ação combinada de determinados dos reagentes com elevadas temperaturas permite a degradação e solubilização da lenhina, facilitando assim a obtenção das fibras de celulose e hemiceluloses intactas [24], [33]. Os processos químicos foram inicialmente desenvolvidos e extensivamente utilizados pela indústria de produção de pasta e de papel, sendo que atualmente continuam a ser o processo de obtenção de fibras da madeira mais utilizado a nível mundial [24]. Esta vasta utilização deve-se ao facto dos processos químicos permitirem a remoção de grande parte da lenhina o que facilita posteriores processos de branqueamento e além disso as fibras obtidas apresentam boas características, como a elevada resistência, o que permitem a obtenção de papel de elevada qualidade [33]. Os processos químicos diferem entre si, no tipo de reagentes utilizados no cozimento da madeira, sendo denominados de diferentes formas [24]. Assim designa-se de processo ao sulfito ácido aquele em cujo cozimento são utilizados sulfito de cálcio (CaSO_3), bissulfito de magnésio, de sódio e de amónia e dióxido de enxofre (SO_2), em condições ácidas. No caso do processo *Kraft* usa-se hidróxido de sódio (NaOH) e sulfureto de sódio (Na_2S) no cozimento da madeira, pelo que ocorre em condições alcalinas, sob temperaturas e pressões elevadas [27]. Este é o processo de produção de pasta de papel mais utilizado a nível mundial [33]. Durante o cozimento da madeira há a degradação das

Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica

ligações éter resultando numa alteração estrutural da lenhina e quebra de ligações glicosídicas, diminuindo as zonas cristalinas da celulose e provocando a solvatação parcial das hemiceluloses. É por isso um processo utilizado em todos os tipos de madeira e onde são obtidas pastas com elevada resistência [24].

A pasta obtida após o processo de cozimento denomina-se de pasta crua. Esta ainda contém alguma lenhina, assim como algumas impurezas, não tendo por isso uma cor branca, mas sim acastanhada conferida pela presença de cromóforos [5]. Para a obtenção de uma pasta com uma cor aceitável e com as restantes características exigidas a nível comercial, para produção de papel, é necessário um processo de branqueamento. Nesta etapa ocorre a oxidação da lenhina residual que não foi retirada durante o processo de cozimento, utilizando diversos oxidantes químicos como o oxigénio, o peróxido de hidrogénio, o ácido peracético, o hipoclorito de sódio, o dióxido de cloro ou outros. O branqueamento é um processo que termina quando se atinge o teor de brancura pretendido de acordo com os objetivos comerciais. A pasta branqueada obtida segue para processos de secagem e posterior produção de papel [34].

Para além da pasta crua, obtém-se também um resíduo líquido denominado por licor negro que é rico em lenhina. O licor negro gerado é encaminhado para uma caldeira de recuperação, sendo sujeito a sucessivos aumentos de pressão e de temperatura, permitindo recuperar os químicos utilizados para reentrarem no processo. Paralelamente à recolha dos químicos ocorre a evaporação do licor negro, originando vapor, que é por sua vez usado na produção de energia. O processo químico de produção de pasta e papel é autossuficiente em termos energéticos, sendo produzida mais energia do que a consumida pela própria fábrica [33].

a) **Obtenção de açúcares fermentáveis a partir de pasta crua**

A pasta crua, produto intermediário na indústria papelreira, é essencialmente constituída por celulose e hemiceluloses, embora em menor percentagem [5]. Como foi mencionado na secção 1.1.1, a celulose é um homopolissacarídeo, constituído por unidades de D- glucose, que pode ser degradada através da ação das celulasas, sendo assim obtidos monómeros ou oligómeros de glucose. As celulasas são enzimas hidrolíticas produzidas por bactérias, fungos e plantas, sendo que a sua estrutura pode conter entre 200 – 800 aminoácidos [26]. *Trichoderma reesei* é atualmente o fungo mais utilizado para a produção completa de celulasas, uma vez que este fungo tem a capacidade de excretar todos os tipos

de enzimas celulolíticas e também hemicelulolíticas particularmente eficientes, sendo por isso utilizado para produção de enzimas para posterior comercialização [35]

A ação das celulasas é afetada por algumas propriedades do substrato como o grau de polimerização, a cristalinidade, a área de contacto e a presença de lenhina [36]. O facto da celulose cristalina ser o maior componente estrutural da parede celular vegetal, faz com que ocorra resistência à degradação enzimática. No entanto, na natureza a celulose raramente é perfeitamente cristalina, sendo que o grau de cristalinidade é muito variado, havendo mesmo zonas onde a estrutura é completamente desordenada. Estas regiões onde a estrutura é mais desordenada são o ponto de partida para o ataque enzimático, por parte das celulasas. A solubilização das zonas cristalinas da celulose exige a ação coordenada de várias enzimas [26], [36].

Todas as celulasas catalisam a clivagem da ligação glicosídica $\beta(1\rightarrow4)$, no entanto, diferenciam-se em relação ao local da cadeia onde atuam. Assim, podem ser classificadas de diferentes formas [6]:

- As exoglucanases dividem-se em celobiohidrolases e glucanohidrolases. No entanto, as glucanohidrolases (EC 3.2.1.74) são pouco usadas, embora possuam a capacidade de libertar diretamente a glucose do polímero. As celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) podem dividir-se em dois tipos, as que removem a celobiose no sentido do terminal não redutor para o terminal redutor (celobiohidrolases I) e as que, pelo contrário, removem a celobiose no sentido oposto ao referido (celobiohidrolases II). Permitem a rápida produção de açúcares solúveis, mas a lenta diminuição do grau de polimerização. As celobiohidrolases têm uma atividade mais elevada na celulose cristalina;
- As endoglucanases (EC 3.2.1.4) hidrolisam as ligações ao acaso no meio da cadeia. A sua ação caracteriza-se pela rápida redução do grau de polimerização, no entanto, libertam lentamente os açúcares da zona cristalina produzindo oligossacarídeos de tamanho variável e glucose.

O modo de atuação das diferentes enzimas responsáveis pela hidrólise da celulose encontra-se ilustrado na Figura 6 [37]. A ação combinada das endoglucanases com as celobiohidrolases resulta em atividades enzimáticas mais elevadas do que a ação das duas

Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica

enzimas separadamente. Este sinergismo pode ser explicado pelo facto das endoglucanases produzirem cadeias de celulose com terminais livres, que funcionam como substrato para as celobiohidrolases. Por vezes, também se observa sinergismo entre as celobiohidrolases, quando uma celobiohidrolase hidrolisa uma cadeia individual de celulose, expondo assim os terminais de uma nova cadeia que podem ser utilizados por outras celobiohidrolases [6].

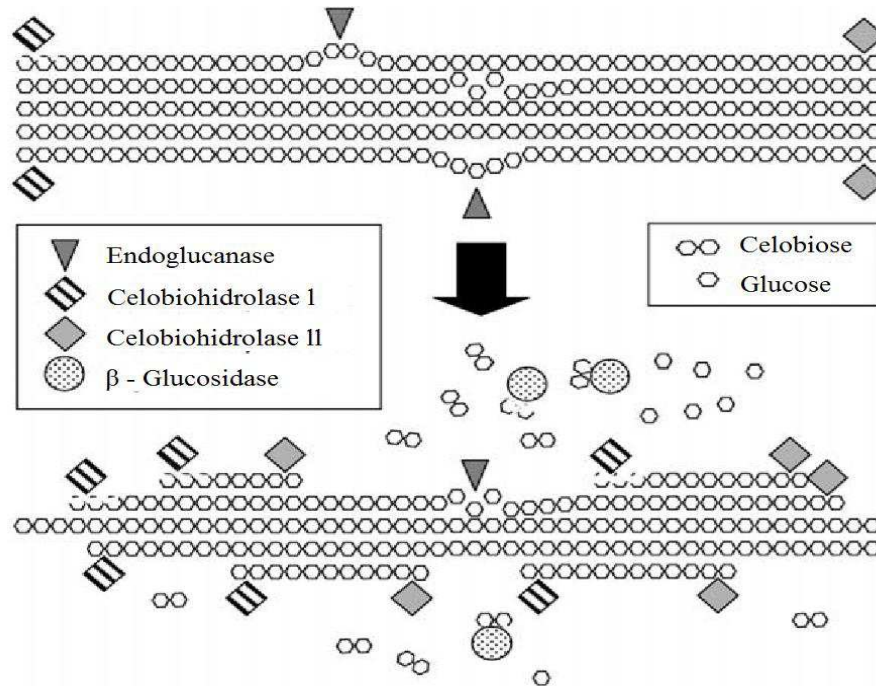


Figura 6. Representação esquemática do processo completo de hidrólise enzimática da celulose. Adaptado de [37]

Os oligossacarídeos e a celobiose produzidos pelas celobiohidrolases e endoglucanases são degradados a glucose pela β -glucosidase (EC 3.2.1.21). Esta enzima não é considerada uma celulase, uma vez que não atua diretamente na celulose, no entanto, é essencial para que se transforme a celobiose nos repetidos monómeros de glucose [6]. Os açúcares obtidos podem posteriormente ser biologicamente convertidos em diferentes produtos de elevado interesse como etanol, ácido acético, ácido láctico, acetona, butanol, ácido succínico e outros produtos de fermentações [17].

1.2 *Actinobacillus succinogenes*

A. succinogenes foi originalmente isolada do rúmen de bovino sendo posteriormente caracterizada por Guettler *et al*, em 1999 [38]. É descrita como uma bactéria anaeróbia facultativa, Gram-negativa, com aptidão para crescer na presença de elevadas concentrações de dióxido de carbono. Além disso, é uma bactéria não-móvel que em condições adversas não forma esporos [38]. As suas células podem crescer de forma isolada ou aos pares e muito frequentemente pode ocorrer a formação de células filamentosas. Em meio sólido, as células de *A. succinogenes* crescem em meio *Tryptone Soy Broth* (TSB), sendo que originam colónias circulares, cinzentas, translúcidas, quando incubadas a 37° C na presença de dióxido de carbono [38].

Seguidamente encontra-se um esquema simplificado das vias metabólicas de *A. succinogenes* (Figura 7) [39], [40].

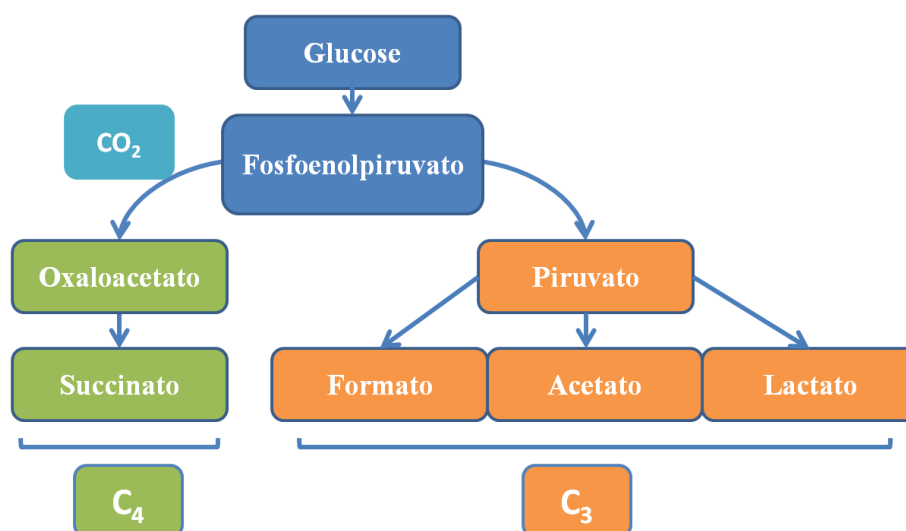


Figura 7. Esquema simplificado das vias metabólicas de *A. succinogenes*. Adaptado de [39], [40]

Como se verificar pela Figura 7, esta bactéria pode produzir diversos ácidos orgânicos como o ácido succínico, o ácido fórmico, o ácido acético e o ácido láctico. Apesar desta variedade de produtos, *A. succinogenes* foi reportada desde há muito tempo como uma das melhores produtoras de ácido succínico, especialmente a estirpe *A. succinogenes* 130 Z [11].

Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica

1.3 Ácido succínico

O ácido succínico ou succinato ($\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$: Figura 8) também conhecido como ácido butanodióico, é um ácido dicarboxílico de extrema importância, uma vez que é denominado como um *building block*, podendo ser convertido em outras famílias de moléculas, de elevado valor acrescentado, sendo a base da plataforma C_4 . Este ácido pode ser produzido através do bioprocessamento de açúcares ou por processos químicos [8].

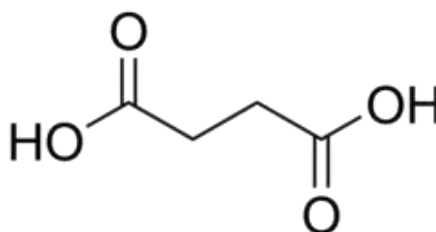


Figura 8. Estrutura química do ácido succínico.

Com base na sua estrutura linear, saturada e de ácido dicarboxílico, o succinato pode ser transformado em diversos compostos como ácido adípico, 1,4- butanodiol, tetrahydrofurano, N- metilpirrolidona, 2- pirrolidona, sais de succinato, γ - butirrolactona, PBS, poliamidas e vários solventes “verdes” [41]. O ácido succínico tem um elevado número de aplicações industriais, pois pode ser utilizado como acidulante, conservante, aromatizante, surfatante, detergente, agente quelante e também como precursor para a síntese de outros compostos farmacêuticos e de novos polímeros biodegradáveis [41], [42]. O PBS é um biopolímero produzido a partir de ácido succínico e de 1,4- butanodiol. O 1,4- butanodiol pode ser produzido através da hidrogenação do ácido succínico quando sujeito a temperaturas compreendidas entre 150-200 °C e com pressões de hidrogénio de 70-140 bar (Figura 9) [43], [44].

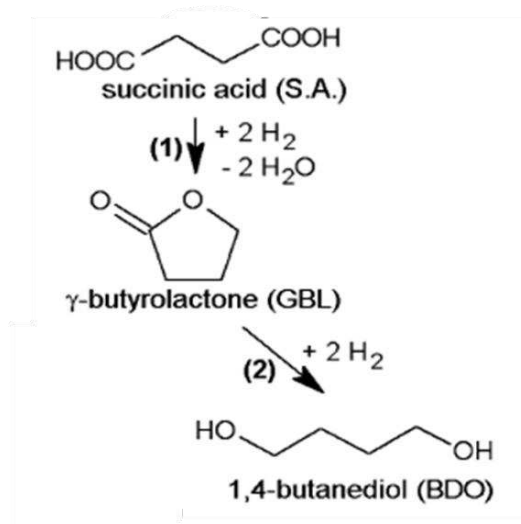


Figura 9. Reação de conversão do ácido succínico em 1,4- butanodiol. Retirado de [43]

A produção de 1,4- butanodiol através de ácido succínico permite a obtenção de um polímero de origem totalmente biológica, constituindo assim uma alternativa ambientalmente sustentável aos plásticos provenientes dos recursos fósseis, motivo pelo qual tem aumentado o interesse na produção de ácido succínico [7], [45]. As reações de produção de PBS encontram-se na Figura 10 [7].

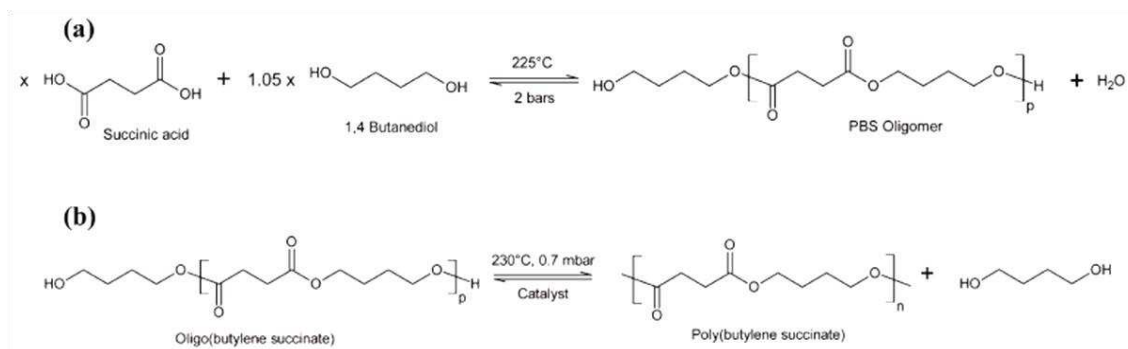


Figura 10. Esquema geral da produção de PBS através de ácido succínico e 1,4- butanodiol. (a): reação de esterificação; (b): reação de transesterificação. Retirado de [7]

O PBS obtido através deste processo apresenta baixa estabilidade térmica e por isso têm sido desenvolvidas estratégias para produção de PBS a temperaturas mais baixas (35 °C), utilizando metais com elevada atividade catalítica, como o titânio [7].

Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica

1.3.1 Produção industrial de ácido succínico

No processo tradicional o ácido succínico é produzido por via petroquímica, através da hidrogenação catalítica dos ácidos insaturados 1,4-dicarboxílicos ou de anidridos e por oxidação de 1,4-butanodiol, embora em menor extensão [9], [43]. No entanto, devido à constante variação do preço do petróleo e aos problemas ambientais associados a este recurso, têm sido desenvolvidas e melhoradas tecnologias ambientalmente sustentáveis para a produção de ácido succínico. A otimização das estratégias biotecnológicas, através do recurso a microrganismos que utilizam matérias-primas renováveis como fonte de carbono tem sido o principal objetivo dos investigadores na produção de ácido succínico [10].

Atualmente, no que diz respeito à produção industrial de ácido succínico, existem 93 patentes registadas, segundo a base de dados WIPO, sendo os Estados Unidos da América detentores de 22 patentes, seguindo-se pela China com 20. Tendo em conta a mesma base de dados, foi possível verificar que foi nos anos 2009 e 2012 que se registou o maior número de patentes referentes à produção biológica de ácido succínico [46].

A produção mundial de ácido succínico aumentou de 15 mil toneladas em 1999, para 35 mil toneladas em 2010 [42], [47]. Este expressivo incremento na produção deve-se sobretudo ao facto da produção biológica de ácido succínico ter aumentado, ao invés da produção petroquímica que se manteve constante durante o mesmo período [43], [44]. A produção de ácido succínico pela via fermentativa tem crescido exponencialmente, sendo que em 2015 se espera que a quantidade de ácido succínico produzido por esta via supere as 150 mil toneladas (Figura 11) [47].

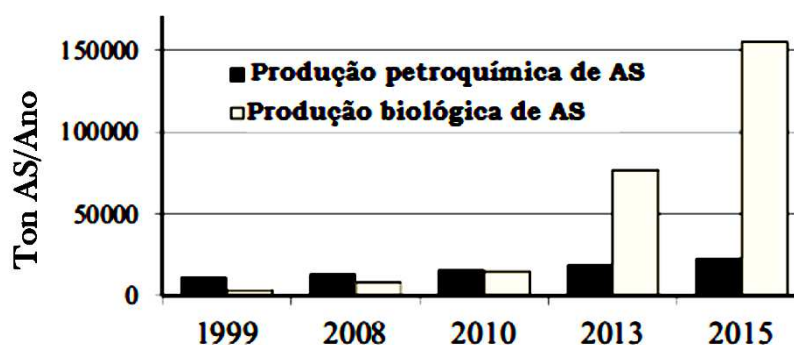


Figura 11. Evolução da produção de ácido succínico a nível mundial, em toneladas métricas por ano. Adaptado de [47]

1.3.2 Microrganismos produtores de ácido succínico

O ácido succínico é naturalmente produzido por plantas, animais e microrganismos, funcionando como um intermediário do ciclo dos ácidos tricarboxílicos [42], [48]. Embora todos os organismos produzam ácido succínico, os fungos e as bactérias têm a capacidade de o produzir de uma forma eficiente. Dos fungos destacam-se os fungos filamentosos *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Byssoschlamys nivea*, *Lentinus degener*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium viniferum* e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Estes fungos produzem ácido succínico em elevadas concentrações tanto em condições de aerobiose como de anaerobiose [49], [50]. As bactérias *Corynebacterium glutamicum*, *Enterococcus faecalis*, *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Actinobacillus succinogenes* e *Mannheimia succiniciproducens* têm de estar em condições de anaerobiose para produzir e acumular ácido succínico de forma eficiente. Das bactérias produtoras distingue-se a *A. succinogenes* como a que tem maior capacidade de produção de elevadas concentrações de ácido succínico [51]–[53]. Em termos metabólicos, o ácido succínico produzido por *A. succinogenes* é obtido através de uma reação de carboxilação do fosfoenolpiruvato (PEP), na qual ocorre a fixação de uma molécula de CO₂ (Figura 12)[54].

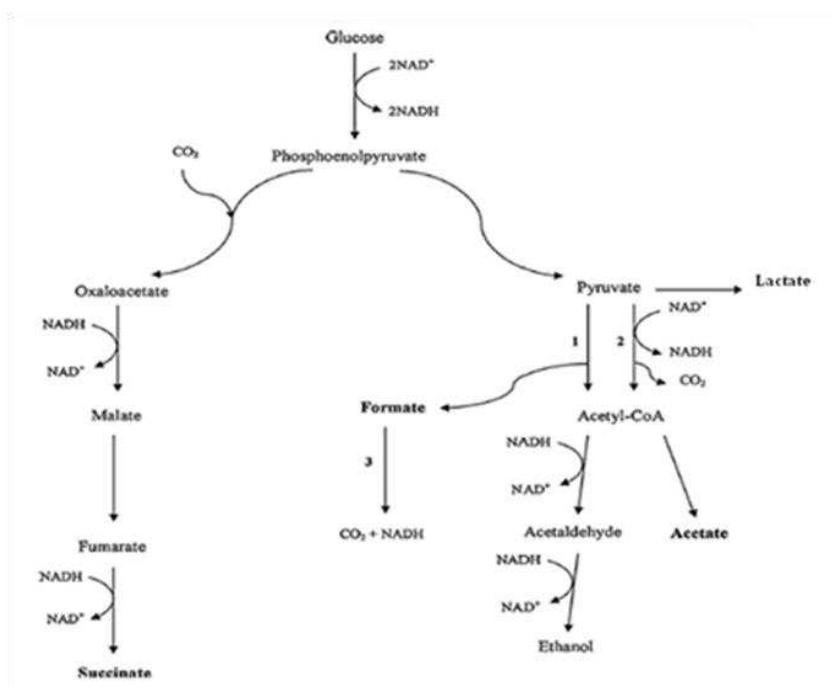


Figura 12. Esquema do metabolismo de produção de ácido succínico (plataforma C₄) e de outros ácidos da plataforma C₃ por *A. succinogenes*. Adaptado de [39], [40]

Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica

Durante a glicólise, *A. succinogenes* metaboliza glucose a PEP. A enzima anidrase carbônica catalisa a reação reversível de hidratação do CO₂, tornando-o disponível para ser utilizado por *A. succinogenes* (Equação 1)[55].



Equação 1

Assim, utilizando o CO₂ e ADP, a enzima PEP-carboxicinase, principal responsável pela produção de ácido succínico, converte o PEP, em oxaloacetato e ATP [50]. A PEP-carboxicinase é fortemente regulada pelos níveis de CO₂, sendo que, elevados níveis de CO₂ têm como consequência elevadas concentrações de PEP-carboxicinase [56],[42]. Após a produção de oxaloacetato, a enzima malato desidrogenase converte o oxaloacetato em malato, posteriormente este é transformado em fumarato através da enzima fumarase. Finalmente, o ácido succínico é obtido pela ação da enzima fumarato redutase sobre o fumarato [39], [40].

A PEP-carboxicinase é a enzima responsável pela assimilação do CO₂, de modo a que o metabolismo seja direcionado para a produção de ácido succínico. Estudos realizados constataram que esta enzima tem uma atividade máxima a um pH de 6,8. Logo, a este valor de pH a utilização de CO₂ é máxima, o que consequentemente permite uma produção máxima de ácido succínico [57].

Como se pode verificar na Figura 12 a existência de CO₂ no meio fermentativo é indispensável para a produção de ácido succínico [56], [58]. O CO₂ pode ser fornecido na forma de gás ou então através da adição de determinados carbonatos. Quando o CO₂ ou os carbonatos se dissolvem em água ocorre a produção de HCO₃⁻ e de CO₃²⁻, sendo que a pH 6,8 a forma HCO₃⁻ é predominante [54]. Quando não é fornecido na forma de gás, os compostos mais utilizados para garantir o fornecimento de CO₂ são o bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e o carbonato de magnésio (MgCO₃) [54], [57].

O rendimento molar teórico referente à produção de ácido succínico em condições de anaerobiose é de uma mole de ácido succínico por mole de glucose, que corresponde a aproximadamente 0,66 g de ácido succínico/g de glucose (Equação 2) [42].



Equação 2

Aquando da produção de ácido succínico ocorre também a produção de outros ácidos orgânicos como o ácido acético e o ácido fórmico. Como se pode constatar na Figura 12, esta coprodução permite a formação de CO₂ e de dadores de eletrões na forma de NADH, de modo a satisfazer o balanço redox. A suplementação do meio fermentativo com excesso de CO₂ e de dadores de eletrões faz com que não seja necessária a ocorrência desta coprodução e consequentemente permite o aumento do rendimento da produção de ácido succínico (Equação 3) [40], [57], [58]. Nestas condições, o rendimento teórico molar alcança as duas moles de ácido succínico por mole de glucose [56].



Nem sempre são conseguidos rendimentos tão elevados devido ao facto da bactéria *A. succinogenes* ser facilmente inibida pelo substrato, quando em elevadas concentrações e pelos produtos ácido succínico, ácido fórmico e ácido acético quando presentes em concentrações superiores a 22 g/L, ou apenas pelo ácido succínico quando em concentrações superiores a 45 g/L [59].

Na Tabela 2 apresentam-se alguns estudos referentes à produção de ácido succínico pela bactéria *A. succinogenes*. Foram realizados estudos em diferentes modos de operação (*batch*, *fed-batch* e contínuo), utilizando diferentes tipos de substratos e matérias-primas renováveis como fonte de carbono. Além disso, foram também desenvolvidas estratégias de forma a alterar geneticamente a bactéria *A. succinogenes*, produzindo assim novas variantes desta bactéria com melhores características, como aumento da resistência a elevadas concentrações de ácido e tolerância a determinados inibidores presentes nas matérias-primas utilizadas. A produção mais elevada de ácido succínico, 101,0 g/L, foi conseguida em modo *batch* através de uma variante da bactéria *A. succinogenes*, utilizando hidrolisado de milho como matéria-prima [11]. Atualmente a produção de ácido succínico é essencialmente realizada por variantes da bactéria *A. succinogenes*, utilizando matérias-primas renováveis como fonte de carbono. Exemplo disso é uma patente recentemente registada, em que se realizaram ensaios em modo contínuo com recirculação de biomassa, tendo sido atingida uma produtividade de 3,87 g/L.h. [60].

Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica

Tabela 2. Estudos referentes à produção de ácido succínico, AS, através de *A. succinogenes*.

Estirpe produtora	Substrato utilizado	Modo de produção	Concentração de AS (g/L)	Produtividade de AS (g/L.h)	Rendimento (g AS/g Glc)	Ref.
<i>A. succinogenes</i> FZ 21	Hidrolisado de milho	<i>Batch</i>	101,0	-	0,92	[11]
<i>A. succinogenes</i> 130 Z	Glucose	Contínuo	48,5	-	0,91	[40]
<i>A. succinogenes</i> 130 Z	Soro de leite	<i>Batch</i>	21,2	0,44	0,57	[61]
<i>A. succinogenes</i> CGMCC 1593	Hidrolisado de milho	<i>Fed-batch</i>	47,4	0,99	0,72	[62]
<i>A. succinogenes</i> CGMCC 2650	Resíduo do cultivo de algodão	<i>Batch</i>	15,8	0,62	1,23 ¹	[63]
<i>A. succinogenes</i> CGMCC 1593	Xilose	<i>Batch</i>	14,2	0,67	0,64 ²	[64]
<i>A. succinogenes</i> CIP 106512	Hidrolisado de bagaço de cana	<i>Batch</i>	22,5	1,01	0,43	[64]
<i>A. succinogenes</i> UK 13	Hidrolisado de milho + glucose	Contínuo com recirculação de biomassa	57,5	3,87	1,05	[60]

¹Rendimento em g AS/g glucose e xilose

²Rendimento em g AS/g xilose

1.4 Ácido láctico

O ácido láctico ou lactato ($\text{CH}_3\text{-CH(OH)-COOH}$: Figura 13), também designado de ácido 2-hidroxipropanoico é um ácido orgânico constituído por um átomo de carbono quiral. Existe na forma de dois enantiómeros – L- lactato e D- lactato- sendo que, dependendo da aplicação, pode ser utilizado apenas um ou os dois isómeros numa mistura racémica [65].

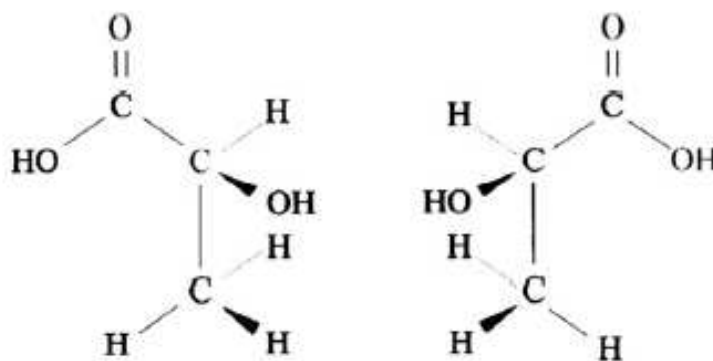


Figura 13. Estrutura dos enantiómeros L e D de ácido láctico.
Retirado de [13]

O ácido láctico é composto por dois grupos reacionais, um grupo carboxilo e um grupo hidroxilo permitindo assim a sua conversão em variados produtos e aplicações em diversas áreas [66]. Foi na área alimentar que o ácido láctico começou a ser maioritariamente utilizado, desempenhando funções de acidificante, conservante e intensificador de sabor. Esta extensa utilização foi também devida ao facto do ácido láctico ser classificado como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) pela FDA, podendo assim ser utilizado como aditivo alimentar [66]. O ácido láctico também é aplicado na indústria têxtil, na farmacêutica para a produção de compostos dermatológicos e na indústria química, uma vez que é utilizado como matéria-prima para a produção de compostos como o ácido acrílico, o propileno-glicol, o ácido propiónico, o acetaldeído, entre outros. Além de todas as aplicações mencionadas, o ácido láctico pode também ser utilizado como monómero na produção de PLA. Este é um biopolímero biodegradável e biocompatível e, constitui uma alternativa ambientalmente sustentável aos plásticos de origem fóssil [66]. Dependendo das características do polímero obtido, como a sua massa molecular e a distribuição dos enantiómeros, este pode ser utilizado em diferentes aplicações. O PLA pode ser sintetizado de diferentes formas, dando origem a diferentes polímeros. Através da condensação direta do ácido láctico são originados polímeros com baixa massa molecular, mas que não

Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica

apresentam as características mecânicas desejadas para algumas aplicações [67]. Estes podem tornar-se polímeros de elevada massa molecular através da adição de cadeias ou de agentes que provoquem reações de esterificação. Ambos estabelecem ligações com os grupos carboxilo ou hidroxilo do polímero. Também podem ser obtidos polímeros de elevada massa molecular diretamente através do ácido láctico pela condensação do ácido láctico (originando polímero de baixo peso molecular), seguida da despolimerização, que permite a obtenção de dímeros cíclicos de ácido láctico (lactide). O processo termina com a polimerização por abertura do anel do dímero de ácido láctico. Os diferentes tipos de polimerização do ácido láctico encontram-se esquematicamente representados na Figura 14 [67], [68].

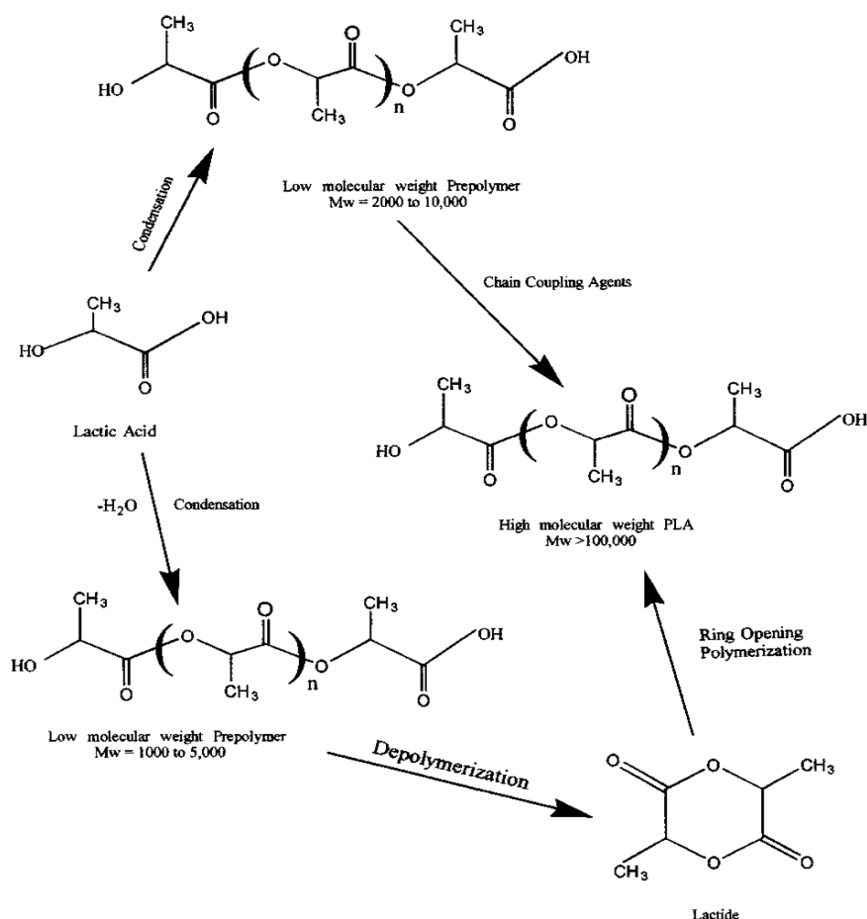


Figura 14. Esquema das diferentes formas de produção de PLA. Adaptado de [68]

1.4.1 Produção industrial de ácido láctico

Na década de 60 foi industrialmente otimizada a produção química de ácido láctico utilizando recursos de origem petrolífera, através da hidrólise do lactato de nitrilo [65], [66]. O ácido láctico obtido através deste processo é sempre constituído pelos dois

enanteómeros [69]. Anos mais tarde, a produção de ácido láctico pela via biotecnológica foi ganhando interesse, uma vez que esta permite a produção de ácido láctico, tirando partido do comportamento fermentativo dos microrganismos (bactérias e fungos), utilizando biomassa como matéria-prima, evitando assim a utilização de produtos descendentes da via petrolífera [66]. Além disso, a produção de ácido láctico pela via fermentativa permite a produção da mistura racémica ou de apenas um dos enanteómeros, L- lactato ou D- lactato. É a especificidade da enzima lactato desidrogenase que determina o rácio de produção de cada um dos enanteómeros [67]. A produção de L-lactato de forma pura é mais abundante que a produção de D-lactato, motivo pelo qual têm sido desenvolvidas estratégias de modificação genética de várias bactérias para que produzam D- lactato em excesso. Este facto limita a utilização de D- lactato em algumas aplicações, uma vez que comercialmente o preço deste enanteómero alcança valores muito elevados [70].

Algumas aplicações do ácido láctico na área alimentar, farmacêutica e médica exigem a utilização de apenas um dos enanteómero, o L-lactato, por questões de biocompatibilidade, uma vez que só este pode ser metabolizado pelos humanos [13].

Nos últimos anos tem-se verificado um aumento na procura de ácido láctico, uma vez que em 2007 se produziram aproximadamente 150 mil toneladas e em 2015 estima-se que sejam alcançadas as 329 mil toneladas. Este incremento deve-se sobretudo ao aumento da produção de PLA [70]. Através da base de dados WIPO é possível verificar que atualmente existem 270 patentes registadas referentes à produção de ácido láctico pela via fermentativa. O maior número de patentes referentes à produção de ácido láctico foi registado nos anos 2012 e 2014 e, a empresa que detém mais patentes é da área alimentar, a NESTEC S.A, seguida por uma empresa da área da química e dos plásticos, Toray Industries, Inc [46].

1.4.2 Microrganismos produtores de ácido láctico

Atualmente, mais de 90 % da produção de ácido láctico é realizada por via fermentativa utilizando fungos e bactérias [70]. Das bactérias produtoras destacam-se as dos géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* e *Enterococcus*. Estas pertencem a um grupo de bactérias designado de LAB (*Lactic Acid Bacteria*), as quais realizam fermentações cujo produto final, e por vezes o único, é o ácido

Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica

lático. Se o produto final é apenas ácido lático as bactérias são designadas de homoláticas, quando ocorre a coprodução de outros produtos, designam-se bactérias heteroláticas. As primeiras têm a capacidade de converter a glucose, através da glicólise, em ácido pirúvico, que posteriormente é reduzido pelo NADH a ácido lático. Assim, através de uma mole de glucose são originadas duas moles de ácido lático. As bactérias heteroláticas transformam a glucose em gliceraldeído-3-fosfato, acetil fosfato e CO₂ pela via das pentoses fosfato. Seguidamente o gliceraldeído-3-fosfato é transformado em ácido lático e o acetil fosfato em ácido acético através da glicólise. Desta forma, através de uma mole de glucose é produzida apenas uma mole de ácido lático. Como as bactérias homoláticas permitem obter maiores valores de rendimento, estas são as mais utilizadas na produção de ácido lático[66]. No que diz respeito aos fungos, destacam-se os filamentosos, uma vez que a sua utilização facilita a separação da biomassa do meio fermentado. Os fungos do género *Rhizopus* são considerados os melhores produtores de ácido lático, além disso, como estes têm a capacidade de produzir e excretar amílases, estas podem atuar sobre determinados substratos amiláceos, não sendo necessário realizar previamente a sua hidrólise [13].

De uma forma geral, a produção de ácido lático pela via fermentativa é um processo rápido (2-4 dias em modo *batch*), no qual se atingem rendimentos superiores a 90 % e para além disso, pode produzir-se um dos enanteómeros ou a mistura racémica, dependendo do microrganismo utilizado [13]. As fermentações mais reportadas ocorrem em operação *batch*, *fed-batch* e contínuo, no entanto, é em *batch* e *fed-batch* que se obtêm maiores concentrações de ácido lático [66]. Em termos de condições de cultura, como temperatura, pH, agitação e arejamento, estas devem ser as ótimas tendo em conta o microrganismo que está a ser utilizado. Embora os microrganismos que produzem ácido lático tenham elevada resistência a pH baixos (< 5), este é um parâmetro que exige especial atenção, uma vez que a constante produção de ácido lático faz com que se atinjam valores de pH muito baixos, o que causa a inibição do microrganismo [13].

Embora não seja muito reportada, a bactéria *A. succinogenes* apresenta capacidade de produzir elevadas concentrações de ácido láctico [12], [71]. Na Figura 15 encontra-se o metabolismo de produção de ácido láctico por *A. succinogenes*.

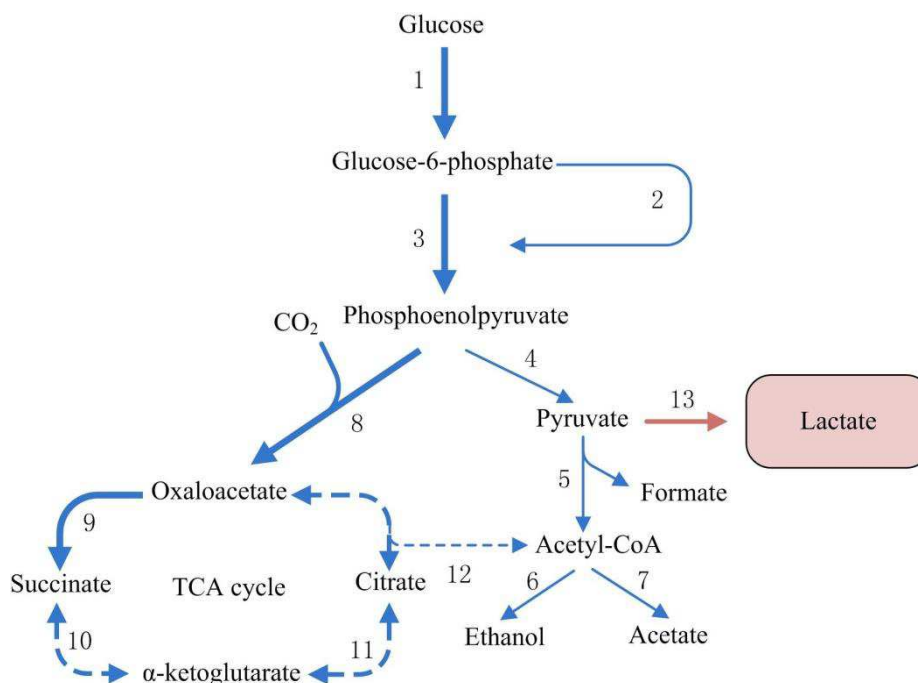
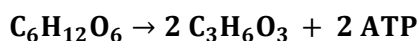


Figura 15. Esquema do metabolismo de produção de ácido láctico por *A. succinogenes*. 1- hexocinase; 2- Via das Pentoses Fosfato; 3- Via de *Emden–Meyerhof–Parnas*; 4- Piruvato cinase; 5- Piruvato Formato Liase; 6- Acetaldeído Desidrogenase; 7- Acetato cinase; 8- PEP carboxicinas; 9- Malato Desidrogenase, Fumarase e Fumarato Resutase; 10- Succinil CoA- Sintetase; 11- Isocitrato Desidrogenase e Aconitase; 12- Citrato Liase e Citrato Sintetase; 13- Lactato desidrogenase. Retirado de [12]

Como se pode verificar na Figura 15, inicialmente a glucose é transformada em PEP, este, através da enzima piruvato cinase (4) é convertido em ácido pirúvico que, pela ação da enzima lactato desidrogenase (13) permite a formação de ácido láctico. Assim, uma mole glucose é convertida em duas moles de ácido láctico, alcançando-se um rendimento teórico máximo de 1,00 g de ácido láctico/g de glucose (Equação 4) [13].



Equação 4

Como referido na secção 1.2 a bactéria *A. succinogenes* é reportada como excelente produtora de ácido succínico quando sujeita a condições de anaerobiose, ocorrendo a incorporação de CO_2 , sendo assim o metabolismo desviado para a produção de precursores C_4 . No entanto, quando a bactéria é inicialmente sujeita a uma fase aeróbia deixa de ocorrer a produção eficiente de precursores C_4 . Isto acontece porque a enzima anidrase

Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica

carbônica, responsável pela captação do CO₂ presente no meio, fica negativamente afetada quando sujeita a oxigénio. Além disso, este arejamento inicial tem também como consequência um aumento de cerca de 18 vezes da atividade da enzima lactato desidrogenase, permitindo assim a elevada produção de ácido láctico. É de salientar que o contacto de *A. succinogenes* com oxigénio faz com que o seu metabolismo seja irreversivelmente desviado, não ocorrendo novamente a produção de ácido succínico de forma eficiente. Contudo, pode ocorrer, embora em baixas concentrações, a produção dos ácidos fórmico, acético e succínico [12].

Apesar de ser necessário o contacto de *A. succinogenes* com oxigénio para que o seu metabolismo seja desviado para a produção de ácido láctico, posteriormente, o crescimento e produção de ácido láctico ocorrem em condições de anaerobiose [12].

Na Tabela 3 encontra-se a comparação entre dois estudos realizados em que foi utilizada *A. succinogenes* para produção de ácido láctico.

Tabela 3. Estudos referentes à produção de ácido láctico, AL, através de *A. succinogenes*

Estripe produtora	Substrato utilizado	Produtividade de AL (g/L. h)	Rendimento (g AL/g Glc)	Ref.
<i>A. succinogenes</i> 130 Z	Glucose	2,94	0,96	[12]
<i>A. succinogenes</i> 130 Z	Glucose	1,53	0,97	[71]

Ambos os estudos foram realizados em dupla fase de arejamento, sendo que inicialmente a bactéria foi sujeita a uma fase aeróbia, na qual ocorreu o desvio do metabolismo para a produção de intermediários C₃. Posteriormente a cultura foi colocada em anaerobiose, ocorrendo assim o crescimento e produção de ácido láctico. Em ambos os estudos foram aplicadas estratégias com o objetivo de evitar a inibição de *A. succinogenes* devido à acumulação de ácido láctico. Li *et al.*, (2010) realizaram os ensaios em modo *fed-batch*, tendo obtido um rendimento de produção de ácido láctico de 0,96 g AL/g Glc [12]. No estudo realizado por Wang *et al.* (2014) foi associado ao processo de fermentação uma membrana de microfiltração, que permite reciclar as células para o fermentador, e uma coluna de adsorção, que permite a remoção do ácido láctico do meio fermentado e a reciclagem dos nutrientes não usados novamente para o reator. Com esta estratégia foi alcançado um rendimento de 0,97 g AL/g Glc [71].

Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica

Após a produção de ácido láctico pela via fermentativa é necessário recorrer a processos de separação e purificação do ácido láctico (passos mais caros de todo o processo de produção de ácido láctico) [13]. Tradicionalmente, após o processo fermentativo, para remover o ácido láctico é adicionada uma base (hidróxido de cálcio) de modo a que ocorra a neutralização do ácido, sendo posteriormente realizados os processos de filtração, concentração e acidificação [67], [70]. No entanto, já foram utilizados outros métodos para a remoção do ácido láctico do meio fermentativo através de membranas, cromatografia de troca iónica, eletrodialise e destilação [13]. Este tipo de processos podem ser integrados no processo de produção, como foi realizado no estudo efetuado por Wang et al, (2014). Assim, à medida que o ácido láctico era produzido, este era removido do meio permitindo assim a sua purificação e evitando a inibição da bactéria pela acumulação de ácido [71].

É de salientar que uma das vantagens de produzir ácido láctico através de processos fermentativos é o facto de poderem ser utilizados resíduos de processos industriais ou biomassa como matéria-prima. No entanto, açúcares obtidos através deste tipo de matérias-primas ainda não foram utilizados por *A. succinogenes* para produção de ácido láctico.

Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica

1.5 Objetivos

A utilização de biopolímeros tem despertado muito interesse devido à sua versatilidade e por constituírem alternativas ambientalmente sustentáveis. Atualmente podem produzir-se monómeros de biopolímeros, nomeadamente de PBS e PLA, tirando partido do comportamento fermentativo de alguns microrganismos e utilizando matérias-primas renováveis como fontes de carbono. Assim, os objetivos deste trabalho foram estudar o comportamento fermentativo de *A. succinogenes* utilizando glucose como fonte de açúcar, de forma a produzir ácido succínico como produto final nomeadamente em frasco encapsulado, Erlenmeyer e biorreator em modo *batch*. Foi também estudada a produção de ácido láctico como produto final em frasco encapsulado e biorreator em modo *fed-batch*. Após a otimização das condições de cultura, escolheu-se o melhor ensaio fermentativo, que foi novamente realizado utilizando como fonte de açúcar o hidrolisado das pastas *Kraft*, fornecido pela Soporcel-Portucel para ver até que ponto será viável a utilização deste tipo de matéria-prima.

Capítulo 2 - Materiais e Métodos

2.1 Matéria-prima

2.1.1 Caracterização da pasta *Kraft* crua

A pasta *Kraft* crua utilizada foi previamente analisada no RAIZ – Instituto de Investigação da Floresta e do Papel. Na Tabela 4 encontra-se a sua caracterização detalhada.

Tabela 4. Caracterização detalhada da pasta *Kraft* crua.

Tipo de Pasta	Humidade (%)	Lenhina (%)	Orgânicos (%)	Celulose (%)	Hemiceluloses (%)	CHC (g/L)
Crua	72,00	2,00	98,0	78,4	19,6	100,00

2.1.2 Hidrólise enzimática da pasta *Kraft* crua

Inicialmente, e com base em ensaios anteriormente feitos, foi estabelecido que o volume total do meio reacional de cada hidrólise e de solução enzimática era 3,0 L e 200,0 mL, respetivamente. O preparado enzimático utilizado foi Novozymes NS, com uma carga enzimática de 20 FPU/g e uma atividade enzimática de 100,5 FPU/mL de enzima. Em anexo encontra-se a explicação detalhada deste procedimento (Anexo 1).

A pasta *Kraft* (Figura 16) e a solução enzimática foram colocadas num banho a 50 °C. Quando atingida esta temperatura, a solução enzimática foi adicionada à pasta *Kraft*, sendo sujeitas, durante 24 h, a agitação mecânica de 100 rpm e uma temperatura de 50 °C. Imediatamente após esta adição, aos 30 e 60 minutos e depois a cada hora até ao fim do ensaio, com exceção do período da noite, foram monitorizados o pH e a temperatura.

Capítulo 2-Materiais e Métodos



Figura 16. Massa de pasta *Kraft* crua pesada e adicionada ao copo onde ocorreu a hidrólise

Sempre que necessário foi ajustada a temperatura e o pH de forma a que estivessem compreendidos entre 45-50 °C e 4,5 e 5,5, respetivamente. Para ajuste do pH foram utilizadas soluções concentradas de H_2SO_4 e NaOH .

Após as 24 h de ensaio a hidrólise foi terminada, sendo o hidrolisado sujeito a filtração a vácuo de forma a remover os sólidos existentes (Figura 17).



Figura 17. Aspeto do hidrolisado após filtração.

De seguida, o hidrolisado filtrado foi esterilizado em autoclave (ajc, Uniclave 88), a uma temperatura de 121 ° C durante 20 minutos. Devido à formação de precipitado aquando da esterilização, o hidrolisado foi centrifugado (Thermo Scientific, Herceus, Megafuge 16 R Centrifuge) a 5000 rpm (3913 x g) durante 1 h, sendo esterilizado, novamente, após a centrifugação. No fim destes tratamentos o hidrolisado foi congelado em porções de volumes pequenos.

2.2 Microrganismo

O microrganismo utilizado foi a bactéria *Actinobacillus succinogenes* 130 Z, fornecida pelo Leibniz Institute DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures.

A cultura inicial de *A. succinogenes* foi separada em dois tipos de subculturas, uma que foi colocada em meio TSB líquido, sendo sempre mantida em condições de anaerobiose - utilizada para a produção de ácido succínico- e outra que foi usada para realização de culturas *stock* utilizando uma solução glicerol 30 %, sendo previamente sujeita a um passo de aerobiose - utilizada para posterior produção de ácido láctico. Ambas as culturas foram posteriormente transferidas para meio TSB sólido (Figura 18).

As culturas de *A. succinogenes* foram repicadas semanalmente em meio TSB com atmosfera rica em azoto, a 37 °C, durante 2 dias e posteriormente mantidas a 4 °C.

De forma a manter as condições de esterilidade, a manipulação do microrganismo foi realizada em câmara de fluxo laminar (B. Braun Horizontal 4).

2.3 Meios de cultura

Todos os meios utilizados neste trabalho foram preparados de acordo com Xi *et al*, (2011) tendo em conta as concentrações que se encontram nas tabelas seguintes [57]. O volume final de cada meio foi perfeito pela adição água destilada.

Capítulo 2-Materiais e Métodos

- Meio de ativação – *Tryptone Soy Broth* (TSB)

Tabela 5. Composição dos meios de ativação sólido e líquido

TSB	Composição
Meio líquido	30 g/L TSB
Meio sólido	30 g/L TSB 20 g/L agar

Composição do meio TSB por cada litro de água destilada: 17 g de peptona de caseína; 3,0 g de peptona de soja; 2,5 g de glucose; 5,0 g de NaCl e 2,5 g de K_2HPO_4 .

- Meio de crescimento (MC) e Meio de fermentação (MF)

Tabela 6. Composição do meios de crescimento (MC) e do meio de fermentação (MF)

Meio	Constituintes	Concentração (g/L)
MC	Glucose	10,0
	Extrato de levedura	5,0
	$NaHCO_3$	10,0
	KH_2PO_4	15,5
	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	8,5
MF	KH_2PO_4	3,0
	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0,20
	$CaCl_2$	0,20
	NaCl	0,10
	Glucose/Hidrolisado	50,0
	$NaHCO_3$	50,0
	Extrato de levedura	10,0

A concentração inicial de glucose/hidrolisado foi variando nos diferentes ensaios, o mesmo aconteceu com a concentração de bicarbonato de sódio, uma vez que esta foi sempre igual à concentração de açúcares. Após a preparação do meio, o pH foi sempre ajustado a 6,8, através da adição de H_2SO_4 96 %.

Todos os meios de cultura e todo o material que esteve em contacto com os microrganismos foram esterilizados em autoclave (ajc, Uniclave 88), a uma temperatura de

121 ° C durante 21 minutos. É de salientar que os açúcares (glucose/hidrolisado) e os fosfatos (KH_2PO_4) foram autoclavados separadamente de forma a evitar reações de Maillard e de complexação, respetivamente.

2.4 Ensaios em frascos encapsulados e Erlenmeyers

2.4.1 Preparação do inóculo

Os inóculos utilizados nas fermentações realizadas em frascos encapsulados e em Erlenmeyers foram preparados a partir de placas de Petri com *A. succinogenes* (Figura 18). Foi retirada uma colónia por cada 5 mL de meio usado. Os inóculos para as diferentes fermentações foram todos preparados da mesma forma.

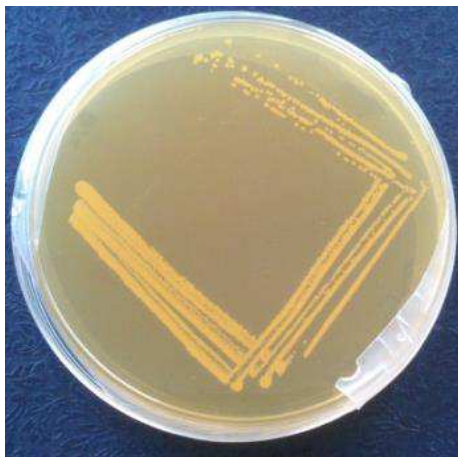


Figura 18. Crescimento de *A. succinogenes* em meio TSB sólido.

2.4.2 Fermentações anaeróbias

Para realizar as fermentações foram utilizados frascos encapsulados e Erlenmeyers selados anaerobiamente (Figura 19). Os frascos encapsulados de 100 mL e os Erlenmeyers de 500 mL foram utilizados com um volume útil de MF de 80 e 300 mL, respetivamente. É de salientar que após cada inoculação foi necessário borbulhar a cultura com azoto, para purgar todo o oxigénio existente dentro do frasco encapsulado/Erlenmeyer, mantendo a cultura em condições anaeróbias. As culturas foram incubadas na incubadora orbital (Stuart SI500) estando sujeitas à temperatura de 37 °C e a uma agitação de 180 rpm.

Capítulo 2-Materiais e Métodos



Figura 19. Imagens referentes a fermentações realizadas em frasco encapsulado e em Erlenmeyer, respectivamente.

2.5 Ensaios em biorreator

2.5.1 Preparação do inóculo

Para as fermentações em biorreator, os inóculos foram efetuados seguindo o procedimento já descrito no ponto 2.4.1, ou seja, colónias de *A. succinogenes* foram colocadas em frasco encapsulado contendo 80 mL de MF. Após purga do meio com azoto, o inóculo foi então incubado a 37 °C e 180 rpm (Stuart SI500) até ser atingido o máximo de concentração de biomassa.

Nos ensaios em que o objetivo era a produção de ácido succínico todo o volume do inóculo (80 mL) foi diretamente utilizado para inocular biorreator. Nos ensaios cujo objetivo era a produção de ácido láctico ocorreu a centrifugação do inóculo (Thermo Scientific, Herceus, Megafuge 16 R Centrifuge) a 1500 rpm (352 x g) durante 15 minutos com o objetivo de concentrar a biomassa. O pellet obtido foi ressuscitado em NaCl 0,9 %, seguidamente mediu-se a absorvância a 660 nm e determinou-se que volume era necessário transferir, de modo a que a absorvância inicial no biorreator fosse 0,10 unidades de absorvância.

2.5.2 Fermentações em biorreator

O equipamento utilizado foi o reator BIOLAB da B. Braun. Este reator é equipado com controlo de temperatura, pH, agitação e entrada de azoto. O reator de 1L foi sempre operado nas mesmas condições: 37 °C; pH de 6,8; caudal de azoto de 150 mL/min com 200 rpm de agitação, com um volume útil de 800 mL quando se realizaram ensaios em modo *batch* ou com um volume útil de 400 mL com a adição de pulsos de 100 mL, quando realizado em modo *fed-batch*. Foram usados NaOH 3M e H₂SO₄ 3M de forma a controlar o pH a 6,8 no decorrer das fermentações (Figura 20).

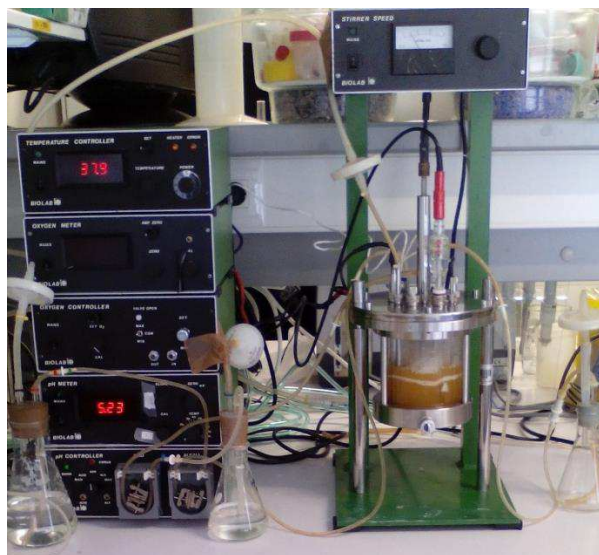


Figura 20. Biorreator em funcionamento

Na Tabela 7 encontra-se o resumo dos ensaios realizados ao longo do trabalho.

Capítulo 2-Materiais e Métodos

Tabela 7. Resumo de todos os ensaios realizados

Tipo de trabalho	Ensaios	Análises realizadas
Produção de hidrolisado	<ul style="list-style-type: none"> • Hidrólise enzimática das pastas <i>Kraft</i> 	HPLC
Escolha do tipo de inóculo a utilizar	<ul style="list-style-type: none"> • Crescimento com inóculo de cultura líquida; • Crescimento com inóculo de cultura <i>stock</i> glicerol; • Crescimento utilizando como inóculo colónias crescidas em meio sólido 	<ul style="list-style-type: none"> • Medição da densidade ótica
Escolha do meio fermentativo	<ul style="list-style-type: none"> • Ensaio utilizando MC; • Ensaio utilizando MF 	<ul style="list-style-type: none"> • Medição da densidade ótica; • HPLC; • Peso seco
Produção de AS	<ul style="list-style-type: none"> • Ensaio em frasco encapsulado; • Ensaio em Erlenmeyer; • Ensaio em biorreator 	<ul style="list-style-type: none"> • Medição da densidade ótica; • HPLC; • Peso seco
Produção de AL	<ul style="list-style-type: none"> • Ensaio teste; • Ensaios em frasco encapsulado com 10, 20 e 30 g/L de glucose; • Ensaio em biorreator em modo <i>fed-batch</i> com 20 g/L de glucose; • Ensaio em biorreator em modo <i>fed-batch</i> com 20 g/L de hidrolisado 	<ul style="list-style-type: none"> • GC-MS; • RMN; • HPLC; • Medição da densidade ótica; • Peso seco

2.6 Métodos analíticos

No decorrer de todas as fermentações foram retiradas amostras periódicas que permitiram a monitorização rápida do pH e da concentração da biomassa. As amostras foram centrifugadas de forma a separar a biomassa. O sobrenadante foi armazenado a 4 °C para análises posteriores.

2.6.1 Quantificação da biomassa

- Densidade ótica

A densidade ótica de cada uma das amostras foi medida a 660 nm utilizando um espectrofotómetro UV Mini-1240, Shimadzu. Previamente foi medida a absorvância do meio a diferentes diluições, de forma a que esse valor fosse subtraído ao valor de absorvância de cada amostra, na respetiva diluição. Assim foi retirada a contribuição do meio na absorvância de cada amostra.

- Peso seco

Como reportado no estudo realizado por Corona-González *et al*, (2008), no fim de cada fermentação, foram centrifugados (Thermo Scientific, Herceus, Megafuge 16 R Centrifuge) a 5000 rpm (3913 x g), durante 20 minutos, diferentes volumes de meio fermentado. Seguidamente a biomassa obtida foi lavada duas vezes com NaCl 0,9 % e colocada na estufa a 80 °C até se obter um peso constante. Foram realizadas 4 réplicas para cada cultura [59]. Foi também medida a absorvância, a 660 nm, do meio fermentado com diferentes diluições. Posteriormente o valor de peso seco obtido foi convertido a concentração através da curva de calibração que relaciona a absorvância a 660 nm com a concentração da biomassa (g/L) (Anexo 2).

2.6.2 Determinação de açúcares e ácidos por HPLC

As amostras das fermentações foram analisadas através de HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*), de forma a verificar as concentrações de açúcares e ácidos orgânicos, nomeadamente glucose, xilose, ácido succínico, ácido fórmico, ácido láctico e ácido acético.

Capítulo 2-Materiais e Métodos

Todas as amostras analisadas foram previamente centrifugadas a 13000 rpm (Mini Spin Eppendorf) durante 3 minutos, e posteriormente filtradas com filtros de 0,22 µm de diâmetro de poro (CoStar).

As análises em HPLC foram realizadas usando uma coluna de troca iônica (Aminex HPX-87H) com dimensões de 300×7,5 mm, um detector de índice de refração Hitachi RI Detector L-2490, uma bomba (Hitachi L- 2130) e um injetor automático (Auto-Sampler Hitachi L- 2200). A temperatura foi fixada a 40 °C através de um forno externo (Gecko 2000). O eluente utilizado foi ácido sulfúrico na concentração de 0,01 N, com um fluxo de 0,6 mL/min. O volume de amostra injetado foi de 20 µL.

Foram previamente injetados os padrões com diferentes concentrações de glucose, xilose, ácido succínico, ácido fórmico, ácido láctico e ácido acético de forma a efetuar a curva de calibração para cada um destes compostos (Anexo 3).

2.6.3 Análises de cromatografia GC-MS

De forma a confirmar a produção de ácido láctico foi realizada a análise de GC-MS (*Gas Chromatography - Mass Spectrometry*) de uma amostra retirada no decorrer de uma fermentação. A amostra foi liofilizada, sendo posteriormente utilizados 10 mg. A esta massa foram adicionados 200 µL de Bis (trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) e 50 µL Trimetilclorosilano (TMSC). A mistura foi deixada a reagir durante 24 h à temperatura ambiente e, posteriormente 0,20 µL de amostra foram injetados em GC-MS (Thermo Scientific Trace GC 2000) de acordo com a metodologia descrita por Marques *et al.* (2009) [72].

2.6.4 Análises de Ressonância Magnética Nuclear, RMN

Inicialmente foram liofilizadas duas amostras, uma retirada no decorrer de uma fermentação e outra amostra que apenas continha MF. Ambas as amostras foram posteriormente dissolvidas em óxido de deutério.

Os espectros ¹H RMN foram obtidos através do espectrofotômetro Bruker AMX 300 que operava à temperatura ambiente e a uma frequência de 300,13 MHz.

Os desvios químicos obtidos nos espectros são relativos ao ácido trimetilsilil-tetradeuteriopropionico (TMSP-d₄), utilizado como padrão interno (δ=0,00 ppm).

2.7 Método de cálculo dos parâmetros fermentativos

Através dos dados obtidos por HPLC, foram calculados:

- Taxa volumétrica de consumo de substrato referente à glucose (g Glc/L.h)

$$r = \frac{(\text{concentração inicial glucose} - \text{concentração final glucose})}{\text{tempo correspondente à concentração final de substrato}}$$

- Taxa volumétrica de produção de ácido succínico, ácido acético, ácido fórmico e ácido láctico (g Produto/L.h)

$$p = \frac{(\text{concentração produto final} - \text{concentração produto inicial})}{\text{tempo correspondente à concentração final de produto}}$$

- Rendimento máximo produto/substrato (g Produto/g Substrato)

$$Y_{P/s} = \frac{(\text{concentração máxima de produto} - \text{concentração inicial de produto})}{(\text{concentração inicial de substrato} - \text{concentração final de substrato})}$$

- Taxa específica de crescimento máximo (h^{-1})

A taxa específica de crescimento máximo (μ_{\max}) é calculada no decorrer da fase exponencial e corresponde ao declive do gráfico que relaciona o logaritmo da concentração celular (X) em função do tempo (t).

$$\ln X_t = \ln X_0 + \mu_{\max} t$$

Capítulo 3 - Resultados e discussão

3.1 Hidrólise enzimática da pasta *Kraft* crua

No início deste trabalho foram realizados quatro ensaios de hidrólise enzimática de pasta *Kraft* crua, tendo sido obtido um volume final de hidrolisado de, aproximadamente, 12 L. Na Figura 21 são apresentados os gráficos referentes à evolução do pH e da temperatura no decorrer das hidrólises. Como se pode verificar, em todos os ensaios o pH e a temperatura estiveram quase sempre nos valores ótimos de atuação da enzima. Verificaram-se maiores oscilações do pH e da temperatura nas primeiras horas das hidrólises, mas depois ocorreu uma estabilização.

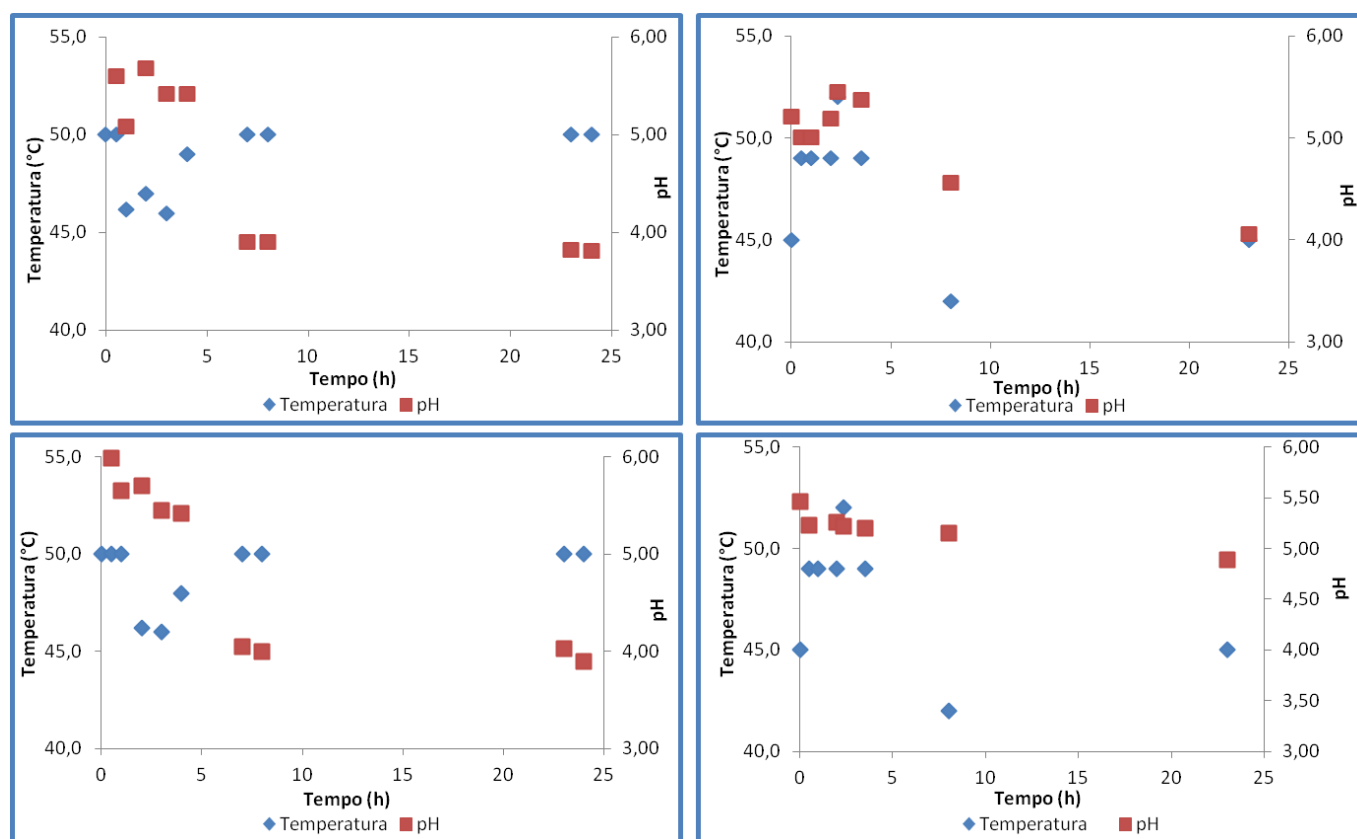


Figura 21. Evolução do pH e da temperatura ao longo das hidrólises.

Estudos anteriormente realizados demonstraram que o preparado enzimático que permite uma maior conversão dos polissacarídeos presentes na pasta *Kraft* crua em monossacarídeos fermentáveis é o Cellic Ctec 2, seguindo-se o Novozymes NS, ambos com uma carga de 35 FPU/g de hidratos de carbono [73]. No entanto, por questões

Capítulo 3- Resultados e Discussão

logísticas as hidrólises foram todas realizadas com o preparado enzimático Novozymes NS.

Posteriormente foi analisada a concentração de açúcares presentes no hidrolisado, através de HPLC, tendo sido obtidos 73,6 g/L de glucose e 19,3 g/L de xilose, perfazendo uma concentração total de açúcares de 92,9 g/L. Tendo em conta os dados que se encontram na Tabela 4 referentes à caracterização da pasta *Kraft* crua, verifica-se que a concentração de hidratos de carbono é de 100,00 g/L. Era esperada a mesma concentração de hidratos de carbono no hidrolisado, no entanto, não foi isso que se verificou, tendo sido obtida uma concentração de monómeros (glucose e xilose) de 92,9 g/L. Após esterilização do hidrolisado verificou-se a formação de precipitado como se pode verificar na Figura 22. Este precipitado foi sujeito a hidrólise ácida, sendo que análises posteriores permitiram perceber que era composto essencialmente por xilanas de baixo peso molecular. Estas correspondem a polissacarídeos que não foram totalmente hidrolisados a monómeros, daí não se ter obtido um hidrolisado com concentração de hidratos de carbono de 100,00 g/L. O aumento do tempo de duração das hidrólises poderia permitir a conversão total dos hidratos de carbono para a forma monomérica.



Figura 22. Aspeto do hidrolisado após esterilização e consequente formação de precipitado.

3.2 Preparação dos inóculos: influência no crescimento

Inicialmente foram realizados vários crescimentos em cultura líquida com meio MF, contendo 50 g/L de glucose, partindo de diferentes tipos de inóculos: cultura líquida (CL), colónias crescidas em meio sólido (CS) e cultura *stock* glicerol (CG). Estes ensaios foram realizados para verificar em qual deles se conseguia um crescimento mais rápido, ou seja, em qual deles se atingia mais rapidamente a concentração máxima de biomassa. Na Figura 23 encontram-se os gráficos referentes a cada um dos crescimentos.

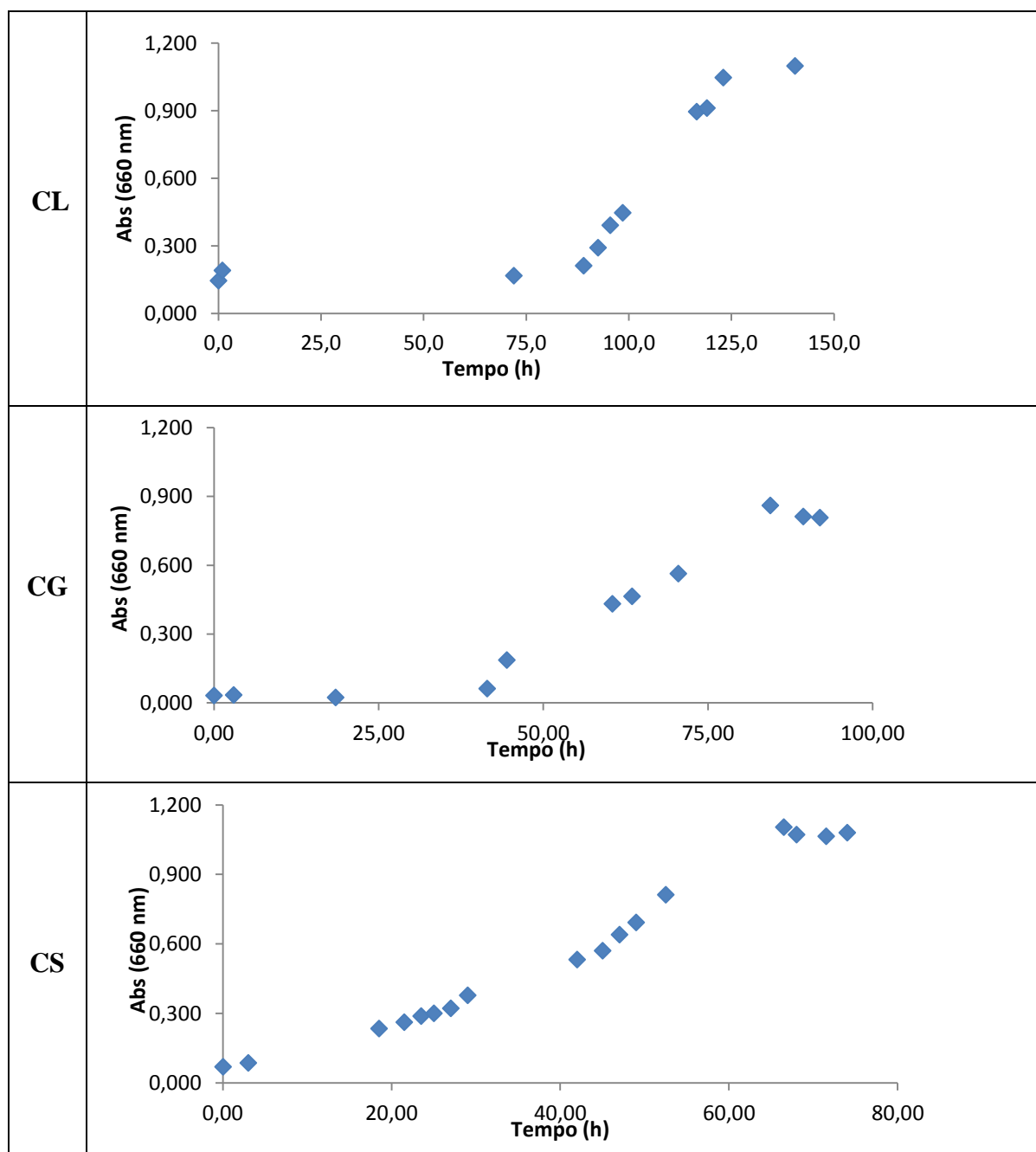


Figura 23. Evolução do crescimento de *A. succinogenes* em MF com diferentes tipos de inóculos: a partir de cultura líquida (CL), cultura *stock* glicerol (CG) e colónias em meio sólido (CS)

Capítulo 3- Resultados e Discussão

É de notar que em todos os crescimentos, independentemente do tipo de inóculo utilizado, foi atingida uma concentração celular máxima semelhante, correspondente a uma absorvância entre 0,80 e 1,1.

Analisando os gráficos da Figura 23, verificam-se diferenças no que diz respeito à duração da fase *lag*, sendo que, a curva de crescimento partindo de CL é a que apresenta uma fase de adaptação mais longa, cerca de 72 h. O crescimento proveniente de CG tem uma fase *lag* de cerca de 40 h, enquanto que na curva de crescimento partindo de CS, a fase de adaptação não é notória, tendo-se verificado crescimento celular logo às 3 h de fermentação.

Aquando da realização do processo de inoculação é extremamente importante escolher culturas cuja concentração de biomassa seja a máxima e além disso, que essa biomassa esteja ativa. É de notar que quanto maior a duração da fase *lag* maior será também o tempo que a cultura demora a atingir o máximo de concentração celular. Atendendo aos gráficos dos crescimentos que se encontram na Figura 23, o ensaio em que se atingiu mais rapidamente o máximo de concentração celular foi o proveniente de CS ao fim de 66 h, seguindo-se pelo originado por CG decorridas 85 h e, finalmente pelo obtido com CL no final de mais de 140 h.

Visto que o crescimento CS é aquele onde *A. succinogenes* tem uma maior capacidade de adaptação ao meio, permitindo assim um crescimento mais rápido, os inóculos foram sempre realizados a partir de uma cultura de *A. succinogenes* crescida em meio sólido (TSB).

3.3 Produção de ácido succínico através de *A. succinogenes*

3.3.1 Meio de crescimento Vs. Meio de fermentação

Nos estudos realizados por Xi *et al.* (2011), os inóculos foram realizados em meio líquido MC e transferidos, no fim da fase exponencial, para MF [57].

Como já foi referido neste trabalho, na secção anterior, 3.2, a transferência de inóculo líquido para novo meio líquido, teve como consequência um aumento da duração da fase *lag* e naturalmente um aumento no tempo do processo fermentativo. Assim, e de forma a otimizar as condições do processo, escolheu-se um único meio para posteriormente se realizarem as fermentações. Compararam-se os ensaios, realizados em frasco encapsulado, em MC, contendo 10 g/L de glucose, e em MF, com 50 g/L de

glucose, de forma a verificar em qual deles se obtinham melhores resultados em termos de rendimento de produção de ácido succínico, taxa específica de crescimento e produção de coprodutos, uma vez que se sabe que esta bactéria produz simultaneamente vários ácidos orgânicos. Os resultados referentes a esses ensaios encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8. Resultados obtidos em fermentações realizadas em meio de crescimento (MC) e meio de fermentação (MF).

	μ_{\max} (h ⁻¹)	Y (g AS/ g Glc)	P _{AS} max. (g AS /L.h)	P _{AF} max. (g AF /L.h)	P _{AA} max. (g AA /L.h)	[AS] max. g/L	[Glc] final g/L	Duração total da fermentação (h)
MC	0,123	0,550	0,099	0,026	0,023	5,30	1,09	67,0
MF	0,115	0,644	0,166	0,012	0,017	22,8	16,5	137

Através dos resultados que se encontram na Tabela 8, pode verificar-se que foi na fermentação realizada em MF que se obteve o maior rendimento de produção de ácido succínico (0,644 g AS/g Glc), assim como uma maior taxa de produção de ácido succínico (0,166 g AS/L.h), em relação à fermentação realizada em MC. Relativamente à taxa específica de crescimento nos diferentes meios, pode verificar-se que o valor em MC (0,123 h⁻¹) é semelhante ao valor obtido em MF (0,115 h⁻¹). Em termos de produção de ácido succínico, na fermentação realizada em MF a concentração máxima atingida foi de 22,8 g AS/L, enquanto que na fermentação realizada em MC apenas se produziu 5,30 g AS/L. A coprodução de ácido fórmico e de ácido acético foi verificada em ambas as fermentações, sendo que a fermentação realizada em MF originou taxas de produção destes ácidos inferiores em relação ao ensaio realizado em MC. No meio MF foram produzidos 0,132 g AF/L e 2,32 g AA/L, enquanto no meio MC a concentração máxima de ácido fórmico atingida foi de 1,46 g/L e a de ácido acético foi de 1,22 g/L.

A fermentação em MF decorreu durante cerca de 137 h, enquanto que a fermentação em MC durou apenas 67,0 h. O término das fermentações em MF e em MC foi devido a diferentes motivos. O ensaio realizado em MC terminou pelo facto de *A. succinogenes* ter consumido quase a totalidade do substrato existente no meio, tendo

Capítulo 3- Resultados e Discussão

restado no fim da fermentação apenas 1,09 g Glc/L, enquanto que o ensaio realizado em MF terá terminado por inibição de *A. succinogenes* provocada pelo produto. Corona-González *et al* reportaram em 2008 que, quando a concentração total de ácidos existentes no meio fermentativo (ácido succínico, ácido acético e ácido fórmico) atingem uma concentração superior a 22 g/L, ocorre a inibição de *A. succinogenes* [59]. No final da fermentação em MF, a concentração total de ácidos era de aproximadamente 25 g/L e o pH atingiu um valor de 5,5 o que terá sido a razão da paragem da fermentação, não tendo assim ocorrido o consumo total da glucose existente, sendo que ainda restavam no meio 16,5 g Glc/L.

Assim, como os melhores resultados foram atingidos na fermentação realizada em MF, os ensaios posteriores foram todos realizados com este meio, variando apenas a concentração de açúcar e consequentemente a concentração de NaHCO₃, uma vez que estes dois constituintes do meio foram sempre utilizados numa concentração equivalente.

3.3.2 Comparação de ensaios realizados em diferentes sistemas fermentativos

Com o objetivo de verificar qual o comportamento de *A. succinogenes* em diferentes sistemas fermentativos, foram efetuados ensaios em frasco encapsulado, Erlenmeyer e biorreator. Comparando os diferentes sistemas fermentativos, verificam-se diferenças na geometria, no controlo de pH, na agitação, no volume útil, na purga de azoto e na realização do inóculo. Os ensaios realizados em frasco encapsulado e Erlenmeyer são semelhantes uma vez que as condições utilizadas foram exatamente iguais: agitação orbital, controlo da temperatura, ausência de controlo de pH, inóculo realizado a partir de colónias crescidas em cultura sólida e purga de azoto realizada apenas após a inoculação. Enquanto que no ensaio realizado em biorreator o processo é diferente uma vez que a agitação era mecânica em vez de orbital o que consequentemente influencia os processos de transferência de massa, o fornecimento de azoto foi constante e fixo durante todo o processo de fermentação, o pH foi automaticamente controlado a 6,8, assim como a temperatura que foi mantida a 37 ° C e o inóculo foi realizado a partir de uma cultura líquida.

Os gráficos referentes às fermentações realizadas em frasco encapsulado, Erlenmeyer e biorreator encontram-se nas Figura 24, Figura 25 e Figura 26, respetivamente.

Em todos os ensaios foi utilizado MF contendo 50 g/L de glucose e de NaHCO_3 .

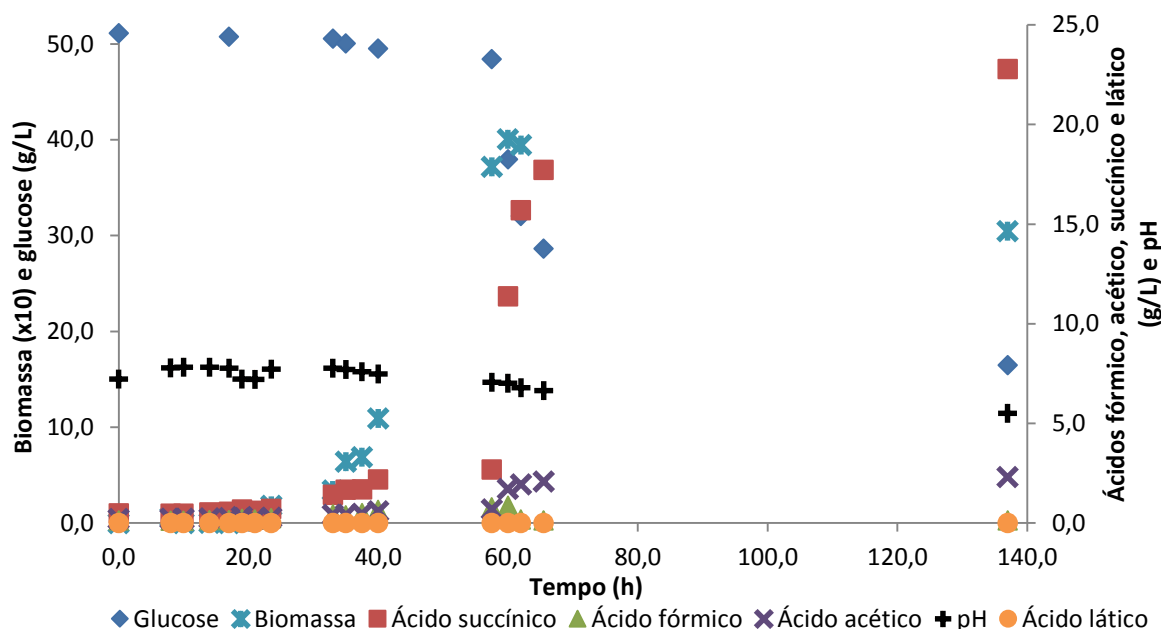


Figura 24. Evolução da fermentação em frasco encapsulado contendo 80 mL de MF

Na Figura 24 encontra-se a evolução da fermentação realizada em frasco encapsulado utilizando 80 mL de MF. Este ensaio decorreu durante cerca de 137 h tendo uma fase inicial de adaptação de 23 h. Durante o processo fermentativo foram consumidos 34,6 g/L de glucose e a concentração máxima de ácido succínico produzida foi de 22,3 g/L. Além de ácido succínico foram também produzidos 2,32 g/L de ácido acético e 0,132 g/L de ácido fórmico. A produção de todos estes ácidos fez com que o pH do meio fermentativo diminuísse até atingir o valor de 5,5.

É de salientar que não se verificou a produção de ácido láctico durante todo o processo fermentativo.

Capítulo 3- Resultados e Discussão

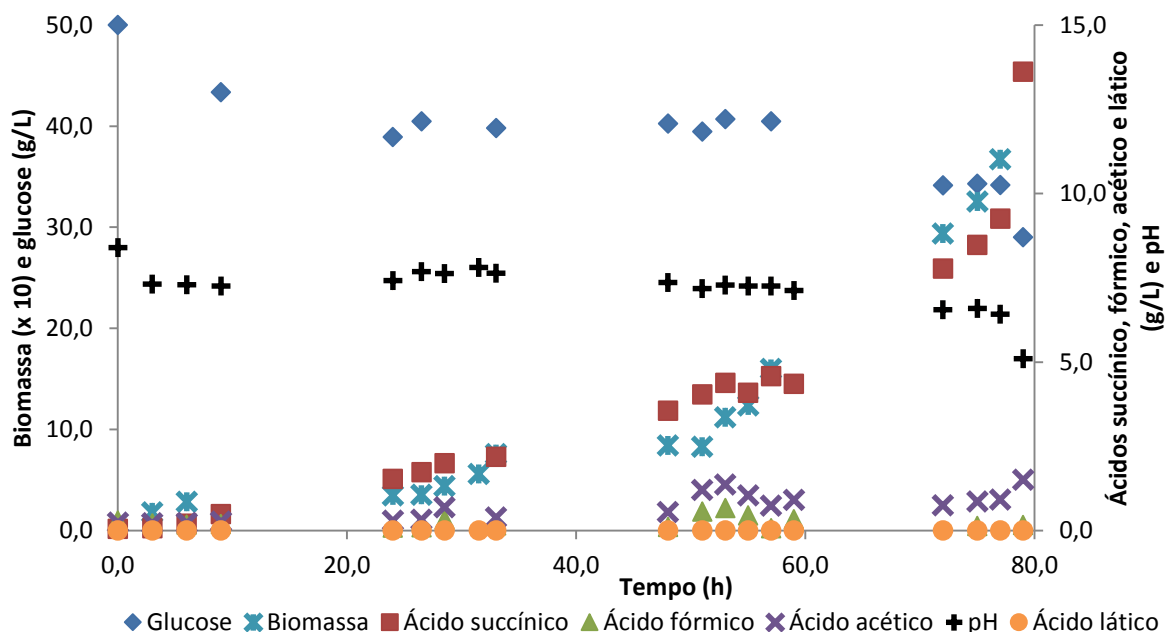


Figura 25. Evolução da fermentação realizada em Erlenmeyer com 300 mL de MF

A fermentação realizada em Erlenmeyer utilizando 300 mL de MF encontra-se representada na Figura 25. Este ensaio decorreu apenas durante 80 h, sendo que nas primeiras 9 h ocorreu a fase *lag*. No decorrer do processo fermentativo foram consumidos 21,0 g/L de glucose e foram produzidos cerca de 13,6 g/L de ácido succínico. A concentração máxima de ácido acético produzido foi de 1,51 g/L, enquanto que a concentração de ácido fórmico não atingiu 1 g/L durante toda a fermentação.

Quando a fermentação foi terminada (às 80 h), embora o pH se encontrasse próximo de 5,0 o que representa uma forte possibilidade da bactéria já estar inibida, não se verifica na Figura 25 que o crescimento da biomassa e o consumo de açúcares tenham cessado. Por esse motivo, esta fermentação deveria ter decorrido durante mais algumas horas.

Tal como no ensaio anterior, não foi verificada a produção de ácido láctico.

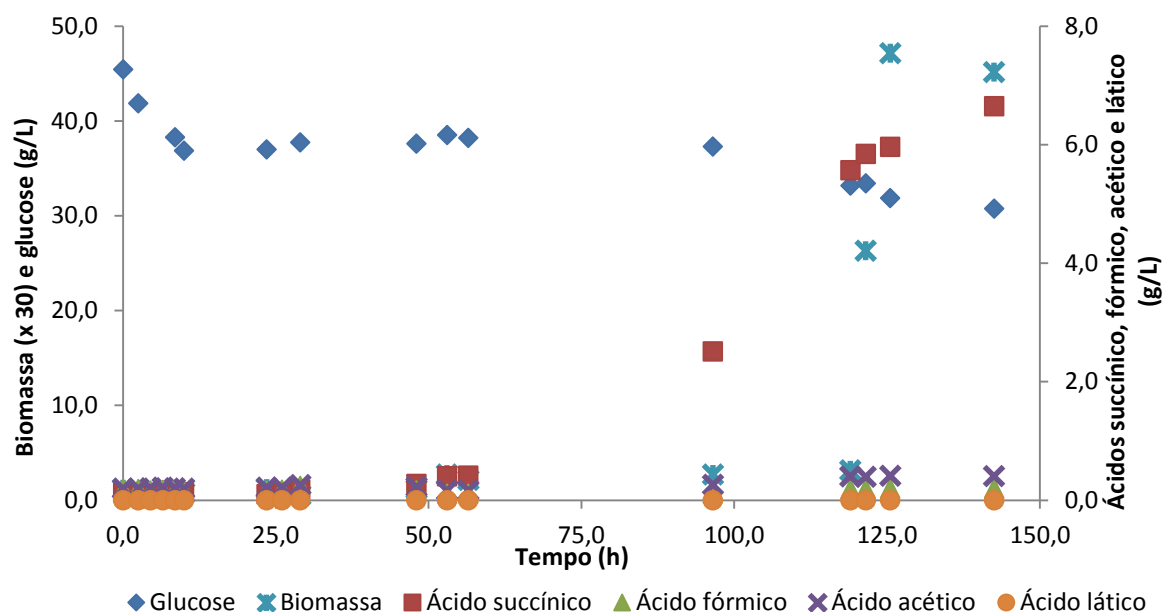


Figura 26. Evolução da fermentação realizada em biorreator utilizando 800 mL de MF com pH controlado a 6,8 através da adição de NaOH.

Na Figura 26 encontra-se a evolução da fermentação realizada em biorreator em modo *batch*, utilizando 800 mL de meio. Neste ensaio que decorreu durante quase 150 h, apenas foram consumidos cerca de 15 g/L de glucose, tendo sido produzidos 6,65 g/L de ácido succínico. Ocorreu uma fase *lag* muito extensa, aproximadamente 50 h, o que pode ser consequência da fermentação se ter iniciado com baixa concentração de biomassa, apenas 0,03 g/L. A produção de ácido fórmico e de ácido acético foi pouco significativa durante todo o processo. Novamente não se verificou a produção de ácido láctico.

Tal como no ensaio anterior a fermentação foi terminada precocemente, uma vez que às 150 h ainda estava a ocorrer o consumo de glucose e a produção de ácido succínico.

Na Tabela 9 encontram-se alguns parâmetros que serão utilizados para avaliar o comportamento de *A. succinogenes* nas diferentes fermentações.

Capítulo 3- Resultados e Discussão

Tabela 9. Comparação entre fermentações realizadas por *A. succinogenes*, utilizando diferentes sistemas fermentativos

Parâmetros Ensaio	Duração fase lag (h)	[X] inicial (g/L)	μ_{max} (h ⁻¹)	Y (g _{AS} /g _{Glc})	P _{AS} max. (g _{AS} /L.h)	P _{AA} max. (g _{AA} /L.h)	P _{AF} max. (g _{AF} /L.h)	r _{Glc} (g _{Glc} /L.h)
Frasco 80 mL	23,0	0,060	0,115	0,644	0,166	0,017	0,012	0,253
Erlenmeyer 300 mL	9,00	0,180	0,146	0,646	0,172	0,016	0,001	0,266
Biorreator 800 mL	50,0	0,038	0,051	0,444	0,046	0,002	-	0,103

As baixas concentrações de biomassa inicial justificam a elevada duração da fase *lag* nos ensaios realizados em frasco encapsulado e em biorreator. O ensaio realizado em Erlenmeyer foi iniciado com maior concentração de biomassa, tendo sido por isso obtida uma fase *lag* menor. Além de se ter repercutido na duração da fase *lag*, a concentração inicial de biomassa também influenciou a taxa específica de crescimento máxima obtida, uma vez que comparando os três ensaios, a maior taxa específica de crescimento máxima obtida foi no ensaio realizado em Erlenmeyer.

Foi na fermentação realizada em frasco encapsulado que se obteve um valor de concentração de biomassa mais elevado, atingindo-se os 4,01 g biomassa/L. Como já referido, os ensaios realizados em Erlenmeyer e em biorreator foram terminados precocemente, motivo pelo qual os valores de biomassa máxima obtidos não tenham ultrapassado os 3,67 e 1,58 g/L, respetivamente.

No que diz respeito aos resultados obtidos nos ensaios realizados em frasco encapsulado e em Erlenmeyer, os valores de rendimento de produção de ácido succínico 0,644 e 0,646 g_{AS}/g_{Glc}, respetivamente, encontram-se muito próximos do valor teórico de conversão de glucose em ácido succínico (0,66 g_{AS}/g_{Glc}).

Como reportado por Carvalho *et al.* (2014), já foram realizadas várias fermentações em frascos, testando diferentes concentrações de glucose (de 0,5 a 30 g/L), sendo que com 30 g/L de glucose foi obtido um rendimento de 0,53 g_{AS}/g_{Glc} e uma taxa específica máxima de crescimento de 0,50 h⁻¹. Em termos de rendimento de produção de ácido

succínico, foi obtido o mesmo valor em ensaios realizados com 10, 15, 20 e 30 g/L de glucose, o que faria prever que concentrações de glucose mais elevadas não permitiriam um aumento do rendimento e que menores valores de μ_{\max} seriam obtidos [74]. Comparando estes valores com os resultados obtidos, verifica-se que um aumento da concentração de glucose para 50 g/L permitiu um incremento significativo do rendimento de produção de ácido succínico para 0,644 g_{AS}/g_{Glc}. No que diz respeito ao valor de μ_{\max} obtido (0,115 h⁻¹) este é muito inferior ao valor conseguido no ensaio com 30 g/L de glucose realizado por Carvalho *et al.* (2014) [74]. Este facto pode ser justificado pelo que Corona-González *et al.*, reportaram em 2008 que, o aumento da concentração inicial de substrato pode provocar a inibição no crescimento da bactéria *A. succinogenes* [59].

Na fermentação realizada em biorreator o rendimento de produção de ácido succínico (0,444 g_{AS}/g_{Glc}), assim como as taxas volumétricas de produção (P) dos coprodutos associados foram inferiores aos restantes ensaios. Corona-González *et al.* (2008) realizaram estudos utilizando exatamente o mesmo volume de meio, alterando apenas a concentração de glucose para 54,7 g/L, tendo obtido um rendimento de 0,62 g_{AS}/g_{Glc} e uma μ_{\max} de 0,16 h⁻¹. Relativamente ao valor da taxa volumétrica de consumo de glucose (r_{Glc}), esta atingiu os 2,42 g_{Glc}/L.h, enquanto que as taxas volumétricas de produção de ácidos succínico, ácido acético e ácido fórmico foram de 1,35; 0,29 e 0,27 g/L.h, respetivamente [59]. Comparando os resultados reportados neste estudo com os obtidos no ensaio realizado em biorreator com 50 g/L de glucose, verifica-se que a baixa concentração de biomassa com que este ensaio em biorreator foi iniciado se repercutiu nos resultados obtidos, originando uma fase *lag* longa, uma taxa específica máxima de crescimento baixa, o que se refletiu posteriormente em taxas de produção muito reduzidas.

3.4 Produção de ácido láctico através de *A. succinogenes*

Como anteriormente referido, há estudos que reportam a utilização de *A. succinogenes* para a produção de ácido láctico [12], [71]. Nesses estudos foram adotadas estratégias como operar em modo *fed-batch* ou associar ao processo de produção uma membrana de microfiltração, de modo a que a acumulação de ácido láctico ocorra de modo controlado, evitando assim a inibição de *A. succinogenes*.

Devido ao facto de *A. succinogenes* ter a capacidade de produzir vários ácidos orgânicos foi realizado um ensaio teste (em frasco encapsulado com MF contendo 10 g/L

Capítulo 3- Resultados e Discussão

de glucose) utilizando *A. succinogenes* com o objetivo de produzir ácido láctico. Algumas amostras desse ensaio foram analisadas através de HPLC, sendo que esta análise não se verificou muito clara. Isto porque o pico referente ao ácido láctico tem um tempo de retenção muito próximo de outros ácidos orgânicos e glicerol, não permitindo a correta distinção entre eles. Além disso, *A. succinogenes* tem a capacidade de produzir de forma pura L-lactato, no entanto os padrões de HPLC referentes ao ácido láctico foram preparados através da mistura racêmica (contendo L- lactato e D- lactato), o que origina a formação de dois picos no cromatograma, dificultando ainda mais a identificação do composto produzido durante as fermentações. Assim, e de forma a confirmar se o composto produzido é o ácido láctico, foram realizadas análises de GC-MS e ^1H RMN.

a) Análises de GC-MS e RMN: confirmação da produção de ácido láctico

Utilizando uma amostra obtida durante a fermentação, esta foi preparada e injetada várias vezes em HPLC de forma poder-se recolher apenas a fração da amostra correspondente ao pico do composto produzido. Essa fração foi posteriormente preparada para realização de análise de GC-MS, sendo que o cromatograma obtido encontra-se na Figura 27.

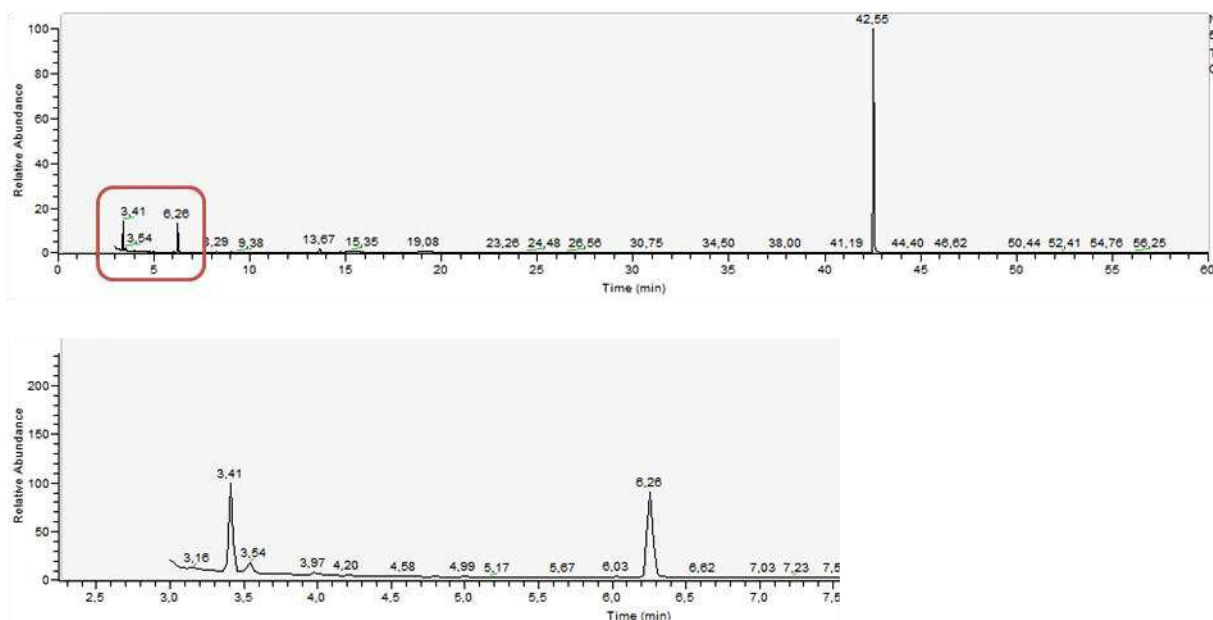


Figura 27. Espetros obtidos após análise de GC-MS de uma amostra contendo o composto produzido

Atendendo ao espectro de GC-MS completo, existem 3 picos com maior abundância relativa, sendo o pico que se observa próximo dos 42 minutos correspondente ao

tetracoseno. Este composto é adicionado ao longo da preparação da amostra e funciona como padrão interno, sendo utilizado para a quantificação de cada um dos compostos presentes na amostra. Além desse, encontram-se mais dois picos, um aos 3,41 minutos e outro aos 6,26 minutos. Tendo em conta o primeiro pico, este originou o espectro que se apresenta a seguir, que corresponde com 77,1 % de probabilidade à acetaldimina (Figura 28). Este composto possivelmente corresponde a uma sujidade eventualmente associada à recolha do pico e respetiva injeção

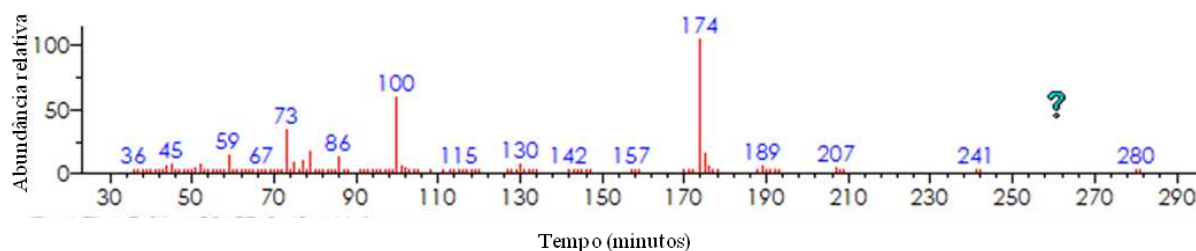


Figura 28. Espectro de massa referente ao pico que se encontra aos 3,41 minutos

Relativamente ao pico dos 6,26 minutos este permitiu obter um espectro de massa (A) que se assemelha, numa probabilidade de 89,9 % ao espectro de massa teórico do ácido láctico (B) fornecido pela biblioteca do próprio equipamento (Figura 29).

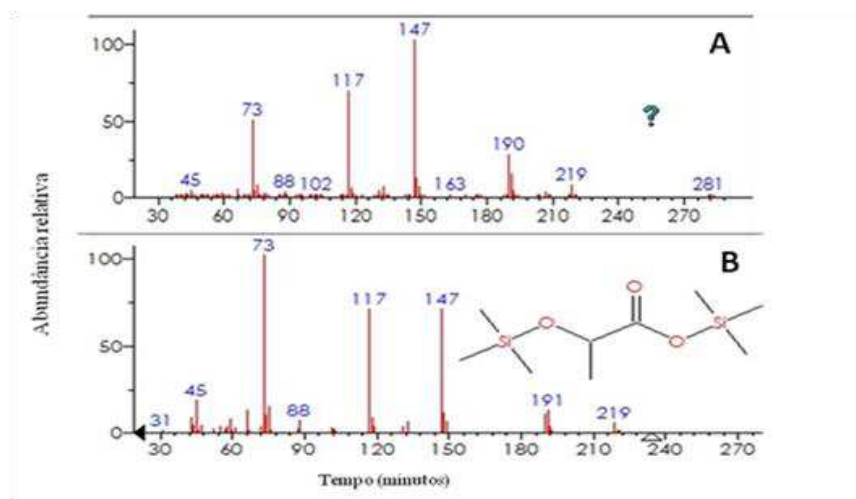


Figura 29. A: Espectro de massa experimental referente ao pico que se encontra aos 6,26 minutos e respetivo espectro de massa teórico (B)

Capítulo 3- Resultados e Discussão

De forma a confirmar os resultados obtidos nas análises de GC-MS foram realizadas análises de ^1H RMN. Foram analisadas duas amostras, uma de MF e uma amostra de meio fermentado. Os espectros obtidos foram analisados e comparados entre si, de forma a perceber quais os sinais que pertencem a componentes existentes no meio. Além disso, foi também necessário recorrer a uma base de dados de forma a verificar quais os desvios químicos teóricos ^1H RMN do ácido láctico. Assim, o espectro teórico do ácido láctico contém dois sinais, um duplete com desvio químico de 1,32 ppm e um quarteto com 4,10 ppm [75]. Seguidamente encontram-se os espectros ^1H RMN obtidos (Figura 30 e Figura 31).

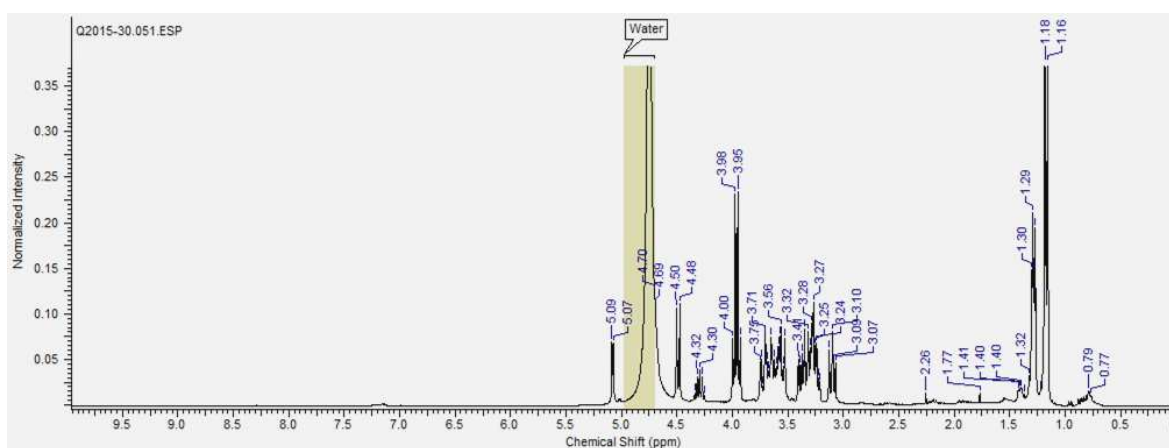


Figura 30. Espectro ^1H RMN obtido para uma amostra de MF

Como se pode verificar, o espectro obtido para a amostra de MF (Figura 30), é composto por um elevado número de sinais o que era previsível tendo em conta a complexidade do meio fermentativo.

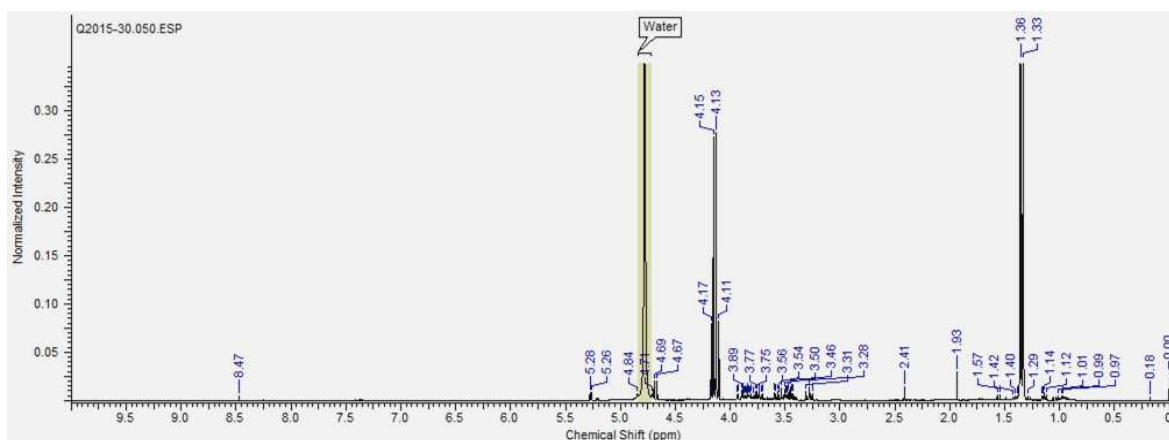


Figura 31. Espectro ^1H RMN obtido para a amostra de fermentado

Tendo em conta o espetro presente na Figura 31, referente à amostra de meio fermentado, verifica-se claramente a existência de um duplete com $\delta=1,35$ ppm e de um quarteto com $\delta=4,14$ ppm. Estes resultados vão de encontro aos desvios químicos teóricos referentes ao ácido láctico [75]. Logo, pode concluir-se, tendo em conta os resultados obtidos através de GC-MS e de ^1H RMN que o composto produzido por *A. succinogenes* durante as fermentações acima mencionadas é ácido láctico.

3.4.1 Estudo da influência de diferentes concentrações iniciais de glucose

Realizaram-se ensaios de forma a perceber qual o comportamento de *A. succinogenes* perante diferentes concentrações iniciais de açúcar no meio fermentativo. Foram realizados ensaios em frasco encapsulado (80 mL) utilizando MF contendo 10, 20 e 30 g/L de glucose, cujos resultados são apresentados seguidamente na Figura 32, Figura 33 e Figura 34, respetivamente.

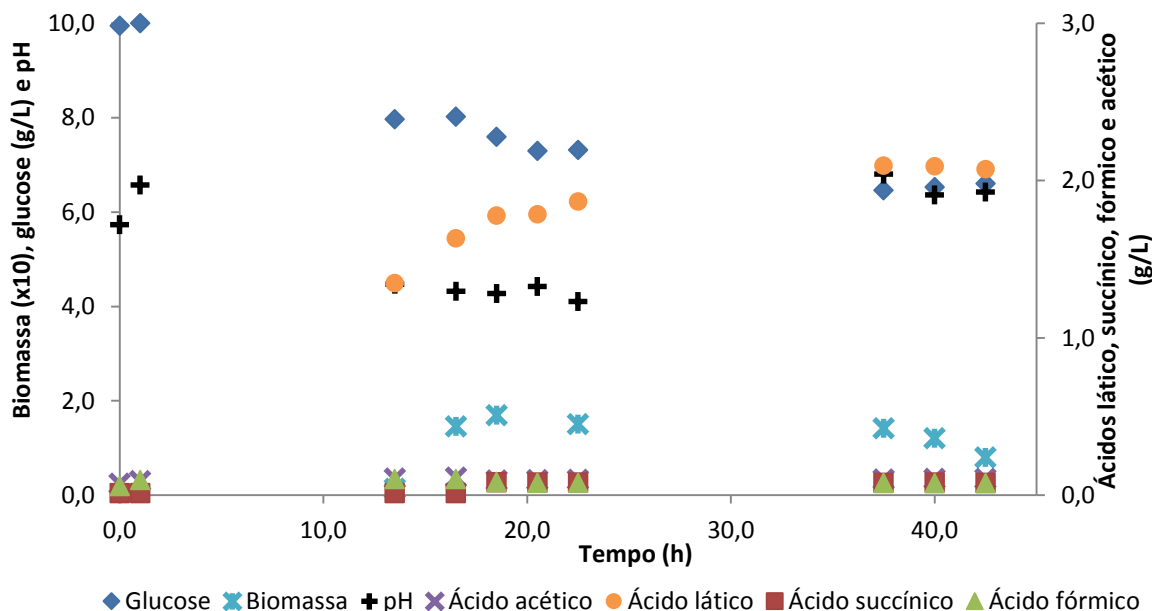


Figura 32. Fermentação realizada em frasco encapsulado contendo 10 g/L de glucose

Na Figura 32 encontra-se a evolução do ensaio realizado em frasco encapsulado. Durante toda a fermentação foram consumidos apenas 3,40 dos 10,0 g/L de glucose presentes no meio. Aproximadamente às 40 h de fermentação foi atingida a concentração

Capítulo 3- Resultados e Discussão

máxima de ácido láctico de 2,09 g/L. A produção do ácido acético, fórmico e succínico não foram significativas ao longo de todo o ensaio. A concentração máxima de biomassa produzida foi de apenas 0,169 g/L, às 18,5 h, sendo que posteriormente ocorreu um decréscimo significativo, conforme se verifica na Figura 32.

É de salientar que das 13,5 às 37,5 h de fermentação o pH esteve muito baixo, próximo de 4,0, o que possivelmente terá provocado a inibição da bactéria, daí o consumo de glucose e a produção de ácido láctico terem cessado. O acerto do pH às 37 h não provocou a ativação da bactéria uma vez que grande parte da biomassa já não se encontrava ativa.

Na Figura 33 está representado um ensaio realizado com 20 g/L de glucose em frasco encapsulado.

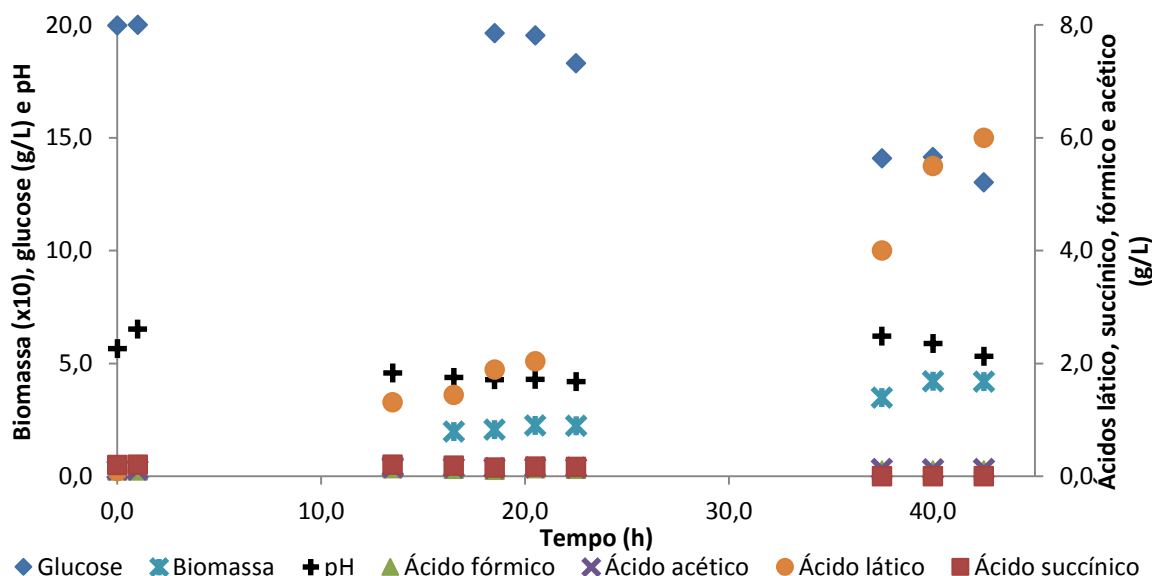


Figura 33. Fermentação realizada em frasco encapsulado contendo 20 g/L de glucose

A glucose consumida, 6,95 g/L, foi utilizada por *A. succinogenes* para a produção de ácido láctico e de biomassa, sendo que as concentrações máximas atingidas foram de 5,91 e 0,451 g/L, respetivamente, não tendo ocorrido uma produção significativa de outros ácidos. Com o aumento da produção de ácido láctico verifica-se o decréscimo do pH, sendo que o valor mais baixo atingido foi de 4,19. O ajuste de pH às 37 h de fermentação permitiu a continuação do consumo de glucose e de produção de ácido láctico. Embora o

crescimento da biomassa tivesse começado a estabilizar após as 40 h, o ensaio deveria ter sido continuado.

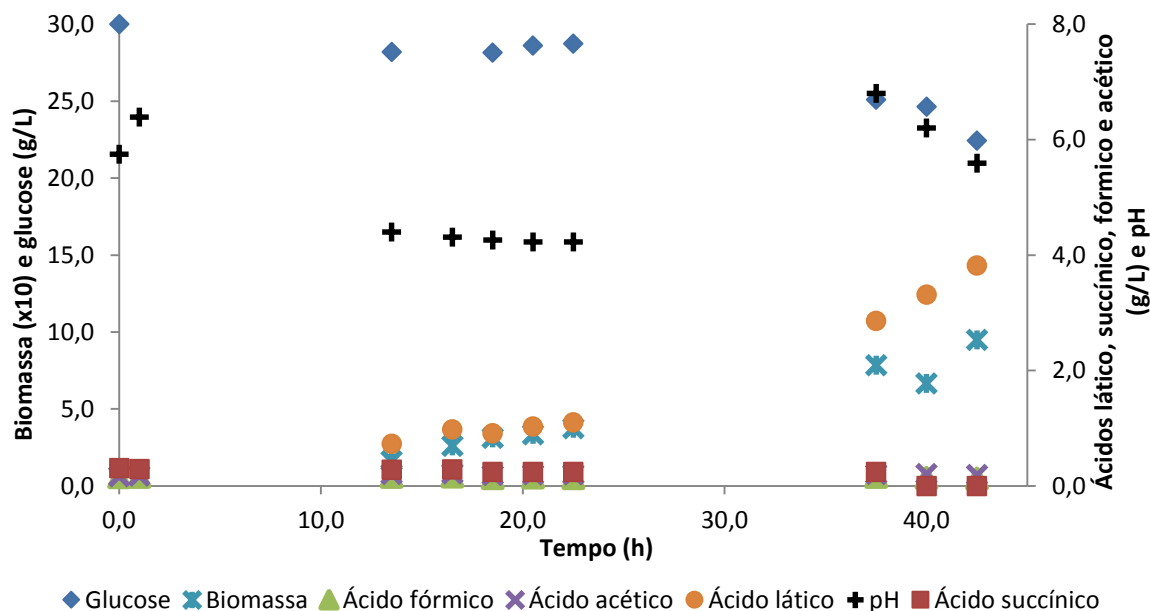


Figura 34. Fermentação realizada em frasco encapsulado contendo 30 g/L de glucose

A Figura 34 representa o ensaio realizado em frasco encapsulado contendo 30 g/L de glucose. Tal como o ensaio anterior, este também foi precocemente terminado, uma vez que após o ajuste do pH às 37 h se verifica um aumento do consumo de glucose e consequentemente uma maior produção de ácido láctico. Foi no último ponto deste ensaio às 42,5 h que se verificou a maior concentração de ácido láctico, 3,82 g/L, assim como a maior concentração de biomassa, 0,991 g/L, tendo sido consumidos 7,56 g/L de glucose.

O ácido láctico foi praticamente o único produto deste ensaio, uma vez que a produção dos restantes ácidos foi nula.

Na Tabela 10 encontram-se alguns parâmetros cinéticos correspondentes aos ensaios realizados em MF com diferentes concentrações de glucose.

Capítulo 3- Resultados e Discussão

Tabela 10. Parâmetros cinéticos correspondentes a ensaios com diferentes concentrações de glucose

Parâmetros [Glc] (g/L)	μ_{\max} (h ⁻¹)	r Glc (g Glc/L.h)	Y (AL/Glc) (g AL/g Glc)	[AL] _{max} (g/L)
10	0,268	0,083	0,618	2,09
20	0,271	0,171	0,850	6,01
30	0,048	0,178	0,409	3,82

Analisando os valores da μ_{\max} verifica-se que foram semelhantes nos ensaios com 10 e 20 g/L de glucose, sendo muito superiores ao valor obtido no ensaio de 30 g/L de glucose, o que significa que *A. succinogenes* cresce mais facilmente e mais rapidamente em meios contendo menor concentração inicial de glucose. No que diz respeito aos valores da taxa volumétrica de consumo de glucose, os ensaios com 20 e 30 g/L de glucose permitiram a obtenção de melhores resultados, ou seja, a velocidade com que a glucose foi consumida nestes ensaios foi superior à do ensaio de 10 g/L. A maior concentração de ácido láctico (6,01 g/L), assim como o maior rendimento de produção de ácido láctico (0,850 g AL/g Glc) foram obtidos no ensaio com 20 g/L. Analisando os parâmetros cinéticos das fermentações realizadas, verifica-se que foi no ensaio com 20 g/L de glucose que, globalmente se obtiveram melhores resultados.

Como foi possível constatar nos ensaios realizados em frasco encapsulado com 10, 20 e 30 g/L de glucose, aquando da produção de ácido láctico, o acerto do pH é essencial para que não aconteça inibição da bactéria e a fermentação ocorra até ao fim. O ácido láctico é um ácido fraco cujo valor de pKa é 3,85. A pH 6,8 (pH ótimo para crescimento de *A. succinogenes*) existe uma fração de ácido láctico na forma protonada, embora não seja a forma predominante. O ácido láctico na forma protonada apresenta características que lhe permite difundir-se através da membrana citoplasmática das células. Ao alcançar o interior das células, cujo pH é neutro, ocorre a dissociação do ácido, libertando-se assim um protão para o citosol. Desta forma o pH intracelular diminui, inibindo assim a proliferação e viabilidade celular [76]. O constante acerto do pH do meio fermentativo para 6,8 permite

que a concentração de ácido láctico na forma protonada diminua e consequentemente o fluxo de ácido para o interior da célula decresça.

Pelo facto de ser necessário um constante controlo de pH para que os ensaios em frasco encapsulado decorram até ao fim e, não sendo isso possível durante o período da noite, os ensaios seguintes de produção de ácido láctico serão realizados em biorreator, com controlo permanente do pH. Além disso, nos estudos reportados de produção de ácido láctico pela bactéria *A. succinogenes* é sempre adotada uma estratégia para evitar que a acumulação de ácido iniba o processo fermentativo. Neste trabalho, a estratégia escolhida foi a realização de ensaios em modo *fed-batch*, tal como no estudo realizado por Li et al. (2010) [12].

3.4.2 Ensaio *fed-batch* contendo 20 g/L de glucose

Na Figura 35 encontra-se a evolução do ensaio realizado em modo *fed-batch* com 20 g/L de glucose.

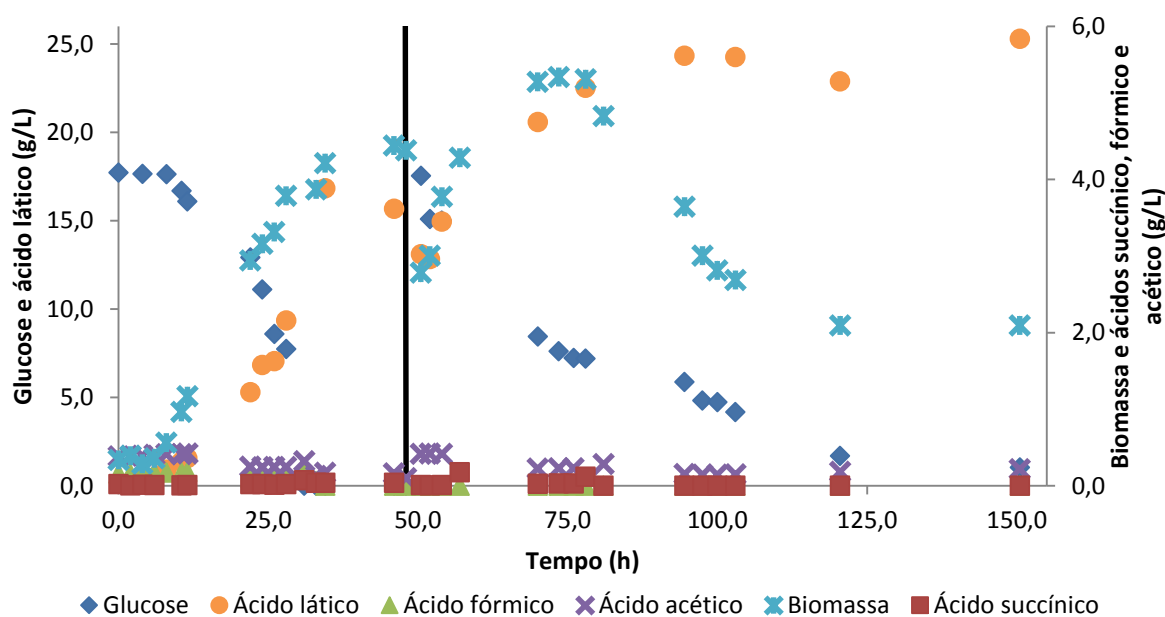


Figura 35. Ensaio realizado em biorreator, em modo *fed-batch* com aproximadamente 20 g/L de glucose e pH controlado a 6,8 pela adição de NaOH. A linha vertical que se encontra próximo das 50 h representa a adição de um pulso de alimentação.

A realização de ensaios em modo *fed-batch* tem como objetivo a maximização da produção de ácido láctico, sem que a acumulação deste provoque a inibição de *A. succinogenes*. O fornecimento de um novo pulso de alimentação tem como objetivo que

Capítulo 3- Resultados e Discussão

seja produzida/acumulada maior quantidade de produto que no pulso anterior e além disso permite diluir o meio fermentativo, atenuando o efeito inibitório do ácido láctico. Além disso, este tipo de processo possibilita o fornecimento de elevadas concentrações de substrato, de forma faseada, permitindo também que não ocorra inibição do microrganismo pelo substrato.

Foi realizado um ensaio modo em *fed-batch* em biorreator, com 20 g/L de glucose, tendo sido fornecido um pulso de alimentação, às 50 h de fermentação, também contendo 20 g/L de glucose. Através da observação da Figura 35 pode verificar-se que toda a glucose foi consumida até às 31 h de fermentação, no entanto, só às 50 h é foi fornecido o pulso de alimentação. A monitorização deste ensaio, em termos de concentração do substrato e dos produtos não foi realizada *online* e por isso a cultura esteve algumas horas sem glucose no meio, antes de ser dado o pulso de alimentação.

Na primeira parte do ensaio (antes do fornecimento do pulso de alimentação) a cultura de *A. succinogenes* demorou cerca de 31 h a consumir toda a glucose existente no meio. A glucose fornecida no pulso de alimentação, às 50 h, foi consumida na totalidade 100 h após o seu fornecimento, no entanto, às 100 h de fermentação poderia ter sido fornecido um novo pulso de alimentação, uma vez que já só existiam no meio cerca de 4 g/L de glucose.

O ácido láctico foi o produto principal desta fermentação, uma vez que a concentração dos ácidos acético, fórmico e succínico, foi muito baixa ou mesmo nula, ao longo de todo o ensaio.

Este ensaio em modo *fed-batch* foi bem-sucedido, uma vez que o fornecimento do pulso de alimentação permitiu que *A. succinogenes* continuasse a produção de ácido láctico, que teria sido interrompida devido à falta de glucose. É de notar que a quebra na concentração de ácido láctico que ocorreu às 50 h foi resultado da diluição do meio provocada pela adição do pulso de alimentação. Na primeira parte do ensaio foram produzidos 16,8 g/L de ácido láctico, o que se refletiu num rendimento de 0,884 g AL/g Glc. A adição do pulso de alimentação permitiu que a concentração de ácido láctico aumentasse até 25,3 g/L, sendo o rendimento da segunda parte do ensaio de 0,739 g AL/g Glc. Tendo em conta que o rendimento teórico máximo de produção de ácido láctico através de glucose é 1,00 g AL/g Glc, os resultados obtidos foram bastante satisfatórios.

3.4.3 Ensaio *fed-batch* com 20 g/L de hidrolisado

Analizando as fermentações realizadas em biorreator em que foi produzido ácido succínico e ácido láctico, verifica-se que o melhor ensaio obtido foi aquele em que se produziu ácido láctico, tendo sido realizado em modo *fed-batch* com 20 g/L de glucose. Este ensaio foi então repetido utilizando 20 g/L de hidrolisado. A evolução dessa fermentação encontra-se na Figura 36.

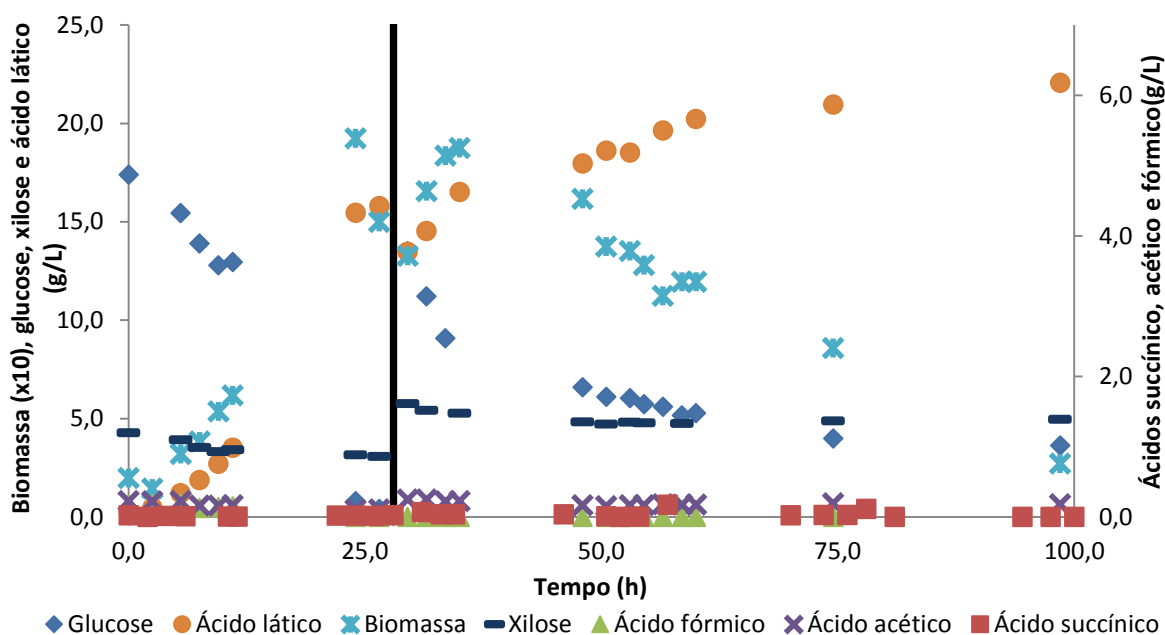


Figura 36. Perfil de concentrações da fermentação realizada em biorreator em modo *fed-batch*, com 20 g/L de hidrolisado e pH controlado a 6,8 através da adição de NaOH. A linha vertical que se encontra próxima das 28,0 h corresponde a um pulso de alimentação.

Como se pode observar pela Figura 36 a duração da fase *lag* foi de apenas 2,5 h, o que demonstra que, tal como esperado, *A. succinogenes* não teve dificuldade em adaptar-se ao meio fermentativo contendo hidrolisado. Além disso, verificou-se que em cerca de 25,0 h toda a glucose existente no meio (17 g/L) foi consumida originando uma taxa volumétrica de consumo de 0,640 g/L.h. A falta de glucose no meio fez com que a concentração de biomassa decrescesse de 19,2 g/L às 24 h para 15,0 g/L às 26,5 h. Depois de toda a glucose ter sido consumida, o consumo de xilose foi praticamente inexistente, o que não era previsto uma vez que esta bactéria é reportada como consumidora deste açúcar [38].

Capítulo 3- Resultados e Discussão

A segunda fase do ensaio, após o fornecimento do pulso de alimentação, durou cerca de 72 h, durante as quais se verificou que a atividade de *A. succinogenes* foi mais lenta do que na primeira fase do ensaio, o que se refletiu numa baixa taxa volumétrica de consumo de glucose, 0,137 g/L.h.

Às 75,0 h de fermentação verificou-se novamente uma quebra na concentração da biomassa e até ao final da fermentação não ocorreram alterações significativas nas concentrações dos substratos e dos produtos, sendo que, no final de 100 h de fermentação ainda havia no meio cerca de 4 g/L de glucose e 5 g/L de xilose. Embora existisse ainda algum açúcar no meio, às 75 h de fermentação poderia ter sido fornecido um novo pulso de alimentação de forma a verificar se ocorria uma nova ativação da cultura e assim fosse acumulada uma maior concentração de ácido láctico.

Na primeira fase do ensaio foram produzidos 15,0 g/L de ácido láctico e na segunda fase obtiveram-se 22,1 g/L de ácido láctico, atingindo-se assim rendimentos de 0,916 e 0,870 g AL/g Glc, respetivamente. Em termos de concentração os restantes ácidos produzidos (acético, fórmico e succínico) nunca atingiram, ao longo de toda a fermentação, concentrações significativas.

a) **Comparação do comportamento fermentativo de *A. succinogenes* com diferentes fontes de açúcar: glucose vs. hidrolisado**

Na Tabela 11 são apresentados parâmetros cinéticos relativos às fermentações *fed-batch* realizadas com diferentes fontes de açúcar, glucose e hidrolisado.

Capítulo 3-Resultados e Discussão

Tabela 11. Comparação dos parâmetros cinéticos referentes aos ensaios *fed-batch* com diferentes fontes de açúcar

Parâmetros Ensaio	Duração da fase <i>lag</i> (h)	r^1 (g Glc/L.h)	[AL] (g/L)	Y^1 (g AL/g Glc)	Y^2 (g AL/g Glc)	Y^G (g AL/g Glc)
<i>Fed-batch</i> 20 g/L Glc	8,0	0,571	16,8 ¹ 25,3 ²	0,884	0,739	0,794
<i>Fed-batch</i> 20g/L Hidrolisado	2,5	0,640	15,0 ¹ 22,1 ²	0,916	0,870	0,898

¹ Referentes à primeira fase do ensaio

² Rendimento da segunda fase do ensaio

^G Rendimento global do ensaio

Parâmetros como a duração da fase *lag* e a taxa volumétrica de consumo de glucose na primeira fase do ensaio (Tabela 11) demonstram maior capacidade de adaptação de *A. succinogenes* ao meio fermentativo contendo hidrolisado em comparação com meio fermentativo contendo glucose. Enquanto que no ensaio com hidrolisado se verificou uma fase *lag* de apenas 2,5 h, no ensaio contendo glucose a fase *lag* durou cerca de 8,0 h. No que diz respeito à taxa volumétrica de consumo de glucose, esta foi mais elevada no ensaio em que foi utilizado hidrolisado, 0,640 g Glc/L.h, o que significa que *A. succinogenes* consumiu o substrato mais rapidamente que no ensaio contendo glucose.

Embora as maiores concentrações de ácido láctico tivessem sido alcançadas no ensaio realizado com glucose, neste também foram consumidas concentrações mais elevadas de substrato e por isso, os melhores rendimentos foram obtidos no ensaio realizado utilizando hidrolisado, tendo sido alcançado um rendimento global de 0,898 g AL/g Glc. Este rendimento foi 12 % superior ao rendimento global obtido no ensaio realizado utilizando glucose como substrato, 0,794 g AL/g Glc.

Assim, pode afirmar-se que há uma melhor adaptação de *A. succinogenes* ao meio que contém hidrolisado, originando fermentações mais rápidas e melhores resultados em termos de produção de ácido láctico.

Capítulo 3- Resultados e Discussão

3.4.4 Outros estudos em que foi produzido ácido láctico através de *A. succinogenes*: comparação com os resultados obtidos

Tabela 12. Parâmetros cinéticos referentes a ensaios realizados e a outros estudos já publicados

Ensaio	Parâmetros	[Substrato] (g/L)	Y (g AL/g Glc)	P (g AL/L.h)	Ref.
<i>Fed-batch</i>		20- Glc	0,794	0,168	Este estudo
<i>Fed-batch</i>		20- Hidrolisado	0,898	0,224	Este estudo
<i>Fed-batch</i> Dupla fase arejamento		60- Glc	0,96	2,94	[12]
Sistema com recirculação celular, Dupla fase de arejamento com microfiltração		60- Glc	0,97	1,53	[71]

Alguns dos estudos existentes de produção de ácido láctico por *A. succinogenes*, reportados na Tabela 12 ocorrem em dupla fase de arejamento, estando inicialmente a bactéria sujeita a uma etapa de aerobiose. Seguidamente esta é sujeita a anaerobiose, que é quando ocorre o crescimento da biomassa e produção de ácido láctico. É de referir que nestes estudos também se verifica a coprodução de outros ácidos orgânicos como o ácido acético, o ácido fórmico e o ácido succínico.

Observando os valores de rendimento e de produtividade de ácido láctico obtidos nos estudos realizados por Li *et al.* (2010) e Wang *et al.* (2014), verifica-se que estes foram mais elevados em relação aos valores obtidos nos ensaios realizados neste trabalho [12], [71]. O facto da etapa de arejamento nestes estudos ter ocorrido imediatamente antes do cultivo em anaerobiose poderá ter-se verificado mais eficaz do que a estratégia adotada nos ensaios realizados, em que a etapa de arejamento ocorreu aquando da realização de culturas *stock* glicérol.

A produção de ácido láctico é apenas a primeira etapa do processo de produção de PLA, seguindo-se a separação e purificação dos monómeros e posterior polimerização. Nesse sentido, o ensaio realizado por Wang *et al.* (2014), em que à produção de ácido láctico foi associado o processo de microfiltração torna-se muito promissor, uma vez que,

Capítulo 3-Resultados e Discussão

além de se ter obtido um elevado rendimento de produção de ácido láctico, ocorre logo a separação do produto de interesse, tornando-se nesse sentido mais eficaz do que os ensaios realizados sem separação do produto [71].

4. Conclusão

A hidrólise enzimática das pastas *Kraft* cruas permitiu a obtenção de um substrato rico em açúcares fermentáveis, cerca de 92 g/L, constituído essencialmente por glucose.

O objetivo deste trabalho era o estudo da produção, por *A. succinogenes*, de ácido succínico e ácido láctico- monómeros que posteriormente poderão ser utilizados para a produção de biopolímeros, PBS e PLA, respetivamente. A produção destes ácidos orgânicos foi inicialmente realizada utilizando glucose como substrato. O melhor ensaio realizado em biorreator foi depois reproduzido, utilizando o hidrolisado das pastas *Kraft* como matéria-prima.

Em termos de produção de ácido succínico o melhor ensaio realizado foi em Erlenmeyer, utilizando 50,0 g/L de glucose, tendo sido obtido um rendimento de 0,646 g AS/g Glc. Em biorreator também foi realizado um ensaio, com 50,0 g/L de glucose, em que se obteve ácido succínico, embora com um rendimento de produção de apenas 0,444 g AS/g Glc.

Em termos de produção de ácido láctico, foi realizado um ensaio em biorreator, em modo *fed-batch*, com uma concentração inicial de glucose de 20 g/L, tendo sido fornecido, no decorrer do ensaio um pulso de alimentação contendo 20 g/L de glucose. Assim, foi obtido um rendimento de 0,794 g AL/g Glc e uma concentração máxima de ácido láctico de 25,3 g/L. Este ensaio foi então o escolhido para realizar utilizando o hidrolisado como fonte de açúcar, sendo assim obtido um rendimento de 0,898 g AL/g Glc. Comparando estes ensaios foi possível verificar que *A. succinogenes* demonstra melhores capacidades de adaptação ao meio fermentativo contendo o hidrolisado, permitindo a obtenção de uma fase *lag* muito mais curta e uma taxa volumétrica de consumo de substrato mais elevada, o que se repercutiu num rendimento de produção de ácido láctico mais elevado.

Com este trabalho verificou-se a capacidade que a estirpe *A. succinogenes* 130 Z, tem para produzir dois compostos de elevado valor acrescentado, como o ácido succínico e o ácido láctico, usando condições de processo específicas. Atualmente estes ácidos orgânicos têm elevado interesse para a produção de biopolímeros, permitindo assim o desenvolvimento de alternativas ambientalmente sustentáveis.

5. Trabalho futuro

O hidrolisado, substrato utilizado neste trabalho, foi obtido através da hidrólise enzimática de pastas *Kraft* de *E. globulus*. Atualmente, devido à elevada qualidade destas pastas, estas são utilizadas para a produção de papel, por isso, em trabalhos futuros deve utilizar-se pastas de baixa qualidade que não tenham aplicabilidade em processos com tanta rentabilidade.

Devem ser realizados mais ensaios em biorreator para a produção de ácido succínico, otimizando as condições de forma a serem obtidos melhores resultados. Além disso, devem também ser realizados ensaios utilizando hidrolisado, pois se através desta matéria-prima foram obtidos bons resultados para a produção de ácido láctico, o mesmo será de prever para a produção de ácido succínico.

No que diz respeito à produção de ácido láctico, deve avaliar-se o comportamento fermentativo de *A. succinogenes* em biorreator, em modo *fed-batch*, com concentrações mais elevadas de hidrolisado. Além disso, devem otimizar-se as fermentações realizadas em modo *fed-batch*, fornecendo os pulsos de alimentação antes que ocorram quebras no processo fermentativo, tal como no nível de concentração da biomassa, permitindo o fornecimento de mais pulsos de alimentação, prolongando os ensaios, podendo assim obter-se concentrações mais elevadas de ácido láctico.

6. Bibliografia

- [1] A. Demirbas, "Biorefineries: Current activities and future developments," *Energy Conversion and Management*, vol. 50, no. 11, pp. 2782–2801, Nov. 2009.
- [2] D. L. A. Fernandes, S. R. Pereira, L. S. Serafim, D. V. Evtuguin, and A. M. R. B. Xavier, "Second Generation Bioethanol from Lignocellulosics: Processing of Hardwood Sulphite Spent Liquor," in *Bioethanol*, M. A. Pinheiro Lima, Ed. Aveiro, Portugal: InTech, 2012.
- [3] M. Balat, "Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review," *Energy Conversion and Management*, vol. 52, no. 2, pp. 858–875, Feb. 2011.
- [4] CELPA, "Boletim Estatístico - Indústria Papeleira Portuguesa," 2013.
- [5] H. Sixta and G. Schild, "A new generation kraft process," *Lenzinger Berichte*, vol. 87, pp. 26–37, 2009.
- [6] L. Lynd and P. Weimer, "Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology," *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 66, no. 3, pp. 506–77, 2002.
- [7] N. Jacquél, F. Freyermouth, F. Fenouillot, A. Rousseau, J. P. Pascault, P. Fuertes, and R. Saint-Loup, "Synthesis and properties of poly(butylene succinate): Efficiency of different transesterification catalysts," *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, vol. 49, no. 24, pp. 5301–5312, Dec. 2011.
- [8] T. Werpy, G. Petersen, A. Aden, J. Bozell, J. Holladay, J. White, A. Manheim, D. Eliot, L. Lasure, and S. Jones, *Top value added chemicals from biomass. Volume 1- Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas*. United States: DTIC Document, 2004.
- [9] A. V. Muzumdar, S. B. Sawant, and V. G. Pangarkar, "Reduction of Maleic Acid to Succinic Acid on Titanium Cathode," *Organic Process Research & Development*, vol. 8, no. 4, pp. 685–688, Jul. 2004.
- [10] R. Hatti-Kaul, U. Törnqvall, L. Gustafsson, and P. Börjesson, "Industrial biotechnology for the production of bio-based chemicals--a cradle-to-grave perspective.," *Trends in biotechnology*, vol. 25, no. 3, pp. 119–24, Mar. 2007.
- [11] M. V. Guettler, M. K. Jain, and D. Rumler, "Method for making succinic acid, bacterial variants for use in the process, and methods for obtaining variants," U.S. Patent No.5,573,931, 12-Nov-1996.
- [12] Q. Li, D. Wang, Z. Song, W. Zhou, Y. Wu, J. Xing, and Z. Su, "Dual-phase fermentation enables *Actinobacillus succinogenes* 130ZT to be a potential role for high-level lactate production from the bioresource," *Bioresource Technology*, vol. 101, no. 19, pp. 7665–7667, 2010.
- [13] F. A. Castillo Martinez, E. M. Balciunas, J. M. Salgado, J. M. Domínguez González, A. Converti, and R. P. D. S. Oliveira, "Lactic acid properties, applications and production: A review," *Trends in Food Science and Technology*, vol. 30, no. 1, pp. 70–83, 2013.
- [14] P. Jambunathan and K. Zhang, "Novel pathways and products from 2-keto acids.," *Current opinion in biotechnology*, vol. 29, no. 10, pp. 1–7, Jan. 2014.
- [15] A. Demirbas, "New liquid biofuels from vegetable oils via catalytic pyrolysis," *Energy Conversion and Management*, vol. 44, no. 9, pp. 2093–2109, 2008.

Bibliografia

- [16] A. Gujrathi and B. Babu, "Environment friendly products from black wattle," *Energy Conversion and Management*, vol. 19, no. 1, pp. 37–44, 2007.
- [17] S. Fernando, S. Adhikari, C. Chandrapal, and N. Murali, "Biorefineries: Current Status, Challenges, and Future Direction," *Energy & Fuels*, vol. 20, no. 4, pp. 1727–1737, Jul. 2006.
- [18] J. A. S. Mendes, A. M. R. B. Xavier, D. V. Evtuguin, and L. P. C. Lopes, "Integrated utilization of grape skins from white grape pomaces," *Industrial Crops and Products*, vol. 49, pp. 286–291, Aug. 2013.
- [19] B. Hahn-Hägerdal, M. Galbe, M. F. Gorwa-Grauslund, G. Lidén, and G. Zacchi, "Bio-ethanol--the fuel of tomorrow from the residues of today.," *Trends in biotechnology*, vol. 24, no. 12, pp. 549–56, Dec. 2006.
- [20] "Grupo Portucel Soporcel | O Grupo - Floresta e Biodiversidade." [Online]. Available: <http://www.portucelsoporcel.com/pt/group/forest.php>. [Accessed: 24-Jan-2015].
- [21] "Products / About us / Borregaard - Borregaard." [Online]. Available: <http://www.borregaard.com/About-us/Products>. [Accessed: 24-Jan-2015].
- [22] D. Fengel and G. Wegener, *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Munchen, Germany: De Gruyter, 1983.
- [23] R. M. Rowell and Levan-Green, *Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites, Second Edition*. CRC Press, 2012, p. 703.
- [24] H. A. Sixta, *Handbook of Pulp*. Lenzing, Austria: Wiley-VCH, 2006.
- [25] M. G. Adsul, M. S. Singhvi, S. a Gaikaiwari, and D. V Gokhale, "Development of biocatalysts for production of commodity chemicals from lignocellulosic biomass.," *Bioresource technology*, vol. 102, no. 6, pp. 4304–12, Mar. 2011.
- [26] M. Ek, G. Gellerstedt, and G. Henriksson, *Pulp and Paper Chemistry and Technology Volume 3*, vol. 3. Stockholm, Sweden: De Gruyter, 2009.
- [27] E. Sjöström, *Wood Chemistry: Fundamentals and Applications*. Espoo, Finland: Academic Press, 1993.
- [28] A. Águas, A. Ferreira, P. Maia, P. M. Fernandes, L. Roxo, J. Keizer, J. S. Silva, F. C. Rego, and F. Moreira, "Natural establishment of *Eucalyptus globulus* Labill. in burnt stands in Portugal," *Forest Ecology and Management*, vol. 323, pp. 47–56, 2014.
- [29] F. X. Catry, F. Moreira, R. Tujeira, and J. S. Silva, "Post-fire survival and regeneration of *Eucalyptus globulus* in forest plantations in Portugal," *Forest Ecology and Management*, vol. 310, pp. 194–203, 2013.
- [30] Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas, "IFN6 – Áreas dos usos do solo e das espécies florestais de Portugal continental em 1995, 2005 e 2010.," Lisboa, 2013.
- [31] J. de Negócios, "Pasta e Papel," 2505, p. 12, May-2013.
- [32] V. Menon and M. Rao, "Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept," *Progress in Energy and Combustion Science*, vol. 38, no. 4, pp. 522–550, Aug. 2012.
- [33] P. Bajpai, *Biotechnology for Pulp and Paper Processing*. Boston, MA: Springer US, 2012.
- [34] SAPPI, "The Paper Making Process From wood to coated paper." SAPPI, Brussels, 2003.

- [35] S. Ahola, X. Turon, M. Osterberg, J. Laine, and O. Rojas, "Enzymatic hydrolysis of native cellulose nanofibrils and other cellulose model films: effect of surface structure," *Langmuir*, vol. 14, no. 9, pp. 11592–11599, 2008.
- [36] Y.-H. P. Zhang and L. R. Lynd, "Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems.," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 88, no. 7, pp. 797–824, Dec. 2004.
- [37] S. Malherbe and T. E. Cloete, "Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications," *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, vol. 1, no. 2, pp. 105–114, Jun. 2002.
- [38] M. V Guettler, D. Rumler, and M. K. Jain, "*Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen.," *International journal of systematic bacteriology*, vol. 49, no. 1, pp. 207–16, Jan. 1999.
- [39] J. B. McKinlay, Y. Shachar-Hill, J. G. Zeikus, and C. Vieille, "Determining *Actinobacillus succinogenes* metabolic pathways and fluxes by NMR and GC-MS analyses of ¹³C-labeled metabolic product isotopomers.," *Metabolic engineering*, vol. 9, no. 2, pp. 177–92, Mar. 2007.
- [40] M. F. A. Bradfield and W. Nicol, "Continuous succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* in a biofilm reactor: Steady-state metabolic flux variation," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 85, no. 4, pp. 1–7, Apr. 2014.
- [41] J. B. McKinlay, C. Vieille, and J. G. Zeikus, "Prospects for a bio-based succinate industry.," *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 76, no. 4, pp. 727–40, Sep. 2007.
- [42] J. G. Zeikus, M. K. Jain, and P. Elankovan, "Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 51, no. 5, pp. 545–552, May 1999.
- [43] C. Delhomme, D. Weuster-Botz, and F. E. Kühn, "Succinic acid from renewable resources as a C4 building-block chemical—a review of the catalytic possibilities in aqueous media," *Green Chemistry*, vol. 11, no. 1, p. 13, 2009.
- [44] I. Bechthold, K. Bretz, S. Kabasci, R. Kopitzky, and a. Springer, "Succinic Acid: A New Platform Chemical for Biobased Polymers from Renewable Resources," *Chemical Engineering & Technology*, vol. 31, no. 5, pp. 647–654, May 2008.
- [45] C. Wang, W. Ming, D. Yan, C. Zhang, M. Yang, Y. Liu, Y. Zhang, B. Guo, Y. Wan, and J. Xing, "Novel membrane-based biotechnological alternative process for succinic acid production and chemical synthesis of bio-based poly (butylene succinate).," *Bioresource technology*, vol. 156, no. 12, pp. 6–13, Mar. 2014.
- [46] "WIPO - Search International and National Patent Collections." [Online]. Available: <https://patentscope.wipo.int/search/en/result.jsf>. [Accessed: 18-Sep-2015].
- [47] J. M. Pinazo, M. E. Domine, V. Parvulescu, and F. Petru, "Sustainability metrics for succinic acid production: A comparison between biomass-based and petrochemical routes," *Catalysis Today*, vol. 239, no. 1, pp. 17–24, Jul. 2015.
- [48] D. L. Nelson and M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4^a ed. W.H.Freeman & CO LTD, 2005, p. 1100.
- [49] C. Rossi, J. Hauber, and T. P. Singer, "Mitochondrial and Cytoplasmic Enzymes for the Reduction of Fumarate to Succinate in Yeast," *Nature*, vol. 204, no. 4954, pp. 167–170, Oct. 1964.
- [50] J. J. Beauprez, M. De Mey, and W. K. Soetaert, "Microbial succinic acid production: Natural versus metabolic engineered producers," *Process Biochemistry*, vol. 45, no. 7, pp. 1103–1114, Jul. 2010.

Bibliografia

- [51] S. E. Urbance, A. L. Pometto, A. A. Dispirito, and Y. Denli, "Evaluation of succinic acid continuous and repeat-batch biofilm fermentation by *Actinobacillus succinogenes* using plastic composite support bioreactors.," *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 65, no. 6, pp. 664–70, Nov. 2004.
- [52] M. Inui, S. Murakami, S. Okino, H. Kawaguchi, A. A. Vertès, and H. Yukawa, "Metabolic analysis of *Corynebacterium glutamicum* during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions.," *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, vol. 7, no. 4, pp. 182–96, Jan. 2004.
- [53] N. Samuelov, R. Datta, M. Jain, and J. Zeikus, "Whey fermentation by *Anaerobiospirillum succiniciproducens* for production of a succinate-based animal feed additive," *Applied and environmental microbiology*, vol. 65, no. 5, pp. 2260–3, May 1999.
- [54] K.-K. Cheng, X.-B. Zhao, J. Zeng, and J.-A. Zhang, "Biotechnological production of succinic acid: current state and perspectives," *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, vol. 6, no. 3, pp. 302–318, May 2012.
- [55] K. S. Smith, C. Jakubzick, T. S. Whittam, and J. G. Ferry, "Carbonic anhydrase is an ancient enzyme widespread in prokaryotes.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, no. 26, pp. 15184–15189, 1999.
- [56] M. J. Van der Werf, M. V. Guettler, M. K. Jain, and J. G. Zeikus, "Environmental and physiological factors affecting the succinate product ratio during carbohydrate fermentation by *Actinobacillus* sp. 130Z.," *Archives of microbiology*, vol. 167, no. 6, pp. 332–42, Jun. 1997.
- [57] Y. Xi, K. Chen, J. Li, X. Fang, X. Zheng, S. Sui, M. Jiang, and P. Wei, "Optimization of culture conditions in CO₂ fixation for succinic acid production using *Actinobacillus succinogenes*," *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, vol. 38, no. 9, pp. 1605–12, Sep. 2011.
- [58] J. B. McKinlay, J. G. Zeikus, and C. Vieille, "Insights into *Actinobacillus succinogenes* fermentative metabolism in a chemically defined growth medium.," *Applied and environmental microbiology*, vol. 71, no. 11, pp. 6651–6, Nov. 2005.
- [59] R. I. Corona-González, A. Bories, V. González-Álvarez, and C. Pelayo-Ortiz, "Kinetic study of succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* ZT-130," *Process Biochemistry*, vol. 43, no. 10, pp. 1047–1053, Oct. 2008.
- [60] G.-T. Chun, S.-M. Park, D. Lee, S. Kim, and K.-R. Eum, "Method of continuous fermentation process for succinic acid by microbila cells of *Actinobacillus succinogenes*," U.S. Patent No. 20,150,104,840, 2015.
- [61] C. Wan, Y. Li, A. Shahbazi, and S. Xiu, "Succinic acid production from cheese whey using *Actinobacillus succinogenes* 130 Z.," *Applied biochemistry and biotechnology*, vol. 145, no. 1–3, pp. 111–9, Mar. 2008.
- [62] P. Zheng, L. Fang, Y. Xu, J.-J. Dong, Y. Ni, and Z.-H. Sun, "Succinic acid production from corn stover by simultaneous saccharification and fermentation using *Actinobacillus succinogenes*," *Bioresource technology*, vol. 101, no. 20, pp. 7889–94, Oct. 2010.
- [63] Q. Li, M. Yang, D. Wang, W. Li, Y. Wu, Y. Zhang, J. Xing, and Z. Su, "Efficient conversion of crop stalk wastes into succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*," *Bioresource technology*, vol. 101, no. 9, pp. 3292–4, May 2010.

- [64] E. R. Borges and N. Pereira, "Succinic acid production from sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes*," *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, vol. 38, no. 8, pp. 1001–11, Aug. 2011.
- [65] K. Hofvendahl and B. HahnHägerdal, "Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 26, no. 0, pp. 87–107, 2000.
- [66] Y. Wee, J. Kim, and H. Ryu, "Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications," *Food Technology Biotechnology*, vol. 44, no. 2, pp. 163–172, 2006.
- [67] A. Södergård and M. Stolt, "Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition," *Progress in Polymer Science (Oxford)*, vol. 27, no. 2, pp. 1123–1163, 2002.
- [68] D. Garlotta, "A Literature Review of Poly (Lactic Acid)," *Journal of Polymers and the Environment*, vol. 9, no. 2, pp. 63–84, 2002.
- [69] K. Okano, T. Tanaka, C. Ogino, H. Fukuda, and A. Kondo, "Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: Recent achievements, perspectives, and limits," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 85, no. 3, pp. 413–423, 2010.
- [70] M. Dusselier, P. Van Wouwe, A. Dewaele, E. Makshina, and B. F. Sels, "Lactic acid as a platform chemical in the biobased economy: the role of chemocatalysis," *Energy & Environmental Science*, vol. 6, no. 5, p. 1415, 2013.
- [71] C. Wang, Q. Li, D. Wang, and J. Xing, "Improving the lactic acid production of *Actinobacillus succinogenes* by using a novel fermentation and separation integration system," *Process Biochemistry*, vol. 49, no. 8, pp. 1245–1250, 2014.
- [72] P. Marques, D. V Evtuguin, S. Magina, F. M. L. Amado, and a Prates, "Chemical Composition of Spent Liquors from Acidic Magnesium–Based Sulphite Pulping of *Eucalyptus globulus*," *Journal of Wood Chemistry and Technology*, vol. 29, no. August 2015, pp. 322–336, 2009.
- [73] A. Ferreira, "Efeito do tratamento hiperbárico na hidrólise de pasta kraft com celulase," Tese de mestrado, Universidade de Aveiro., 2010.
- [74] M. Carvalho, C. Roca, and M. A. M. Reis, "Carob pod water extracts as feedstock for succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* 130Z.," *Bioresource technology*, vol. 170, no. 10, pp. 491–8, Oct. 2014.
- [75] "Human Metabolome Database." [Online]. Available: <http://www.hmdb.ca/>. [Accessed: 17-Aug-2015].
- [76] E. Palmqvist and B. Hahn-Hägerdal, "Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition," *Bioresource Technology*, vol. 74, pp. 25–33, 2000.

Anexos

1. Cálculos para a realização dos ensaios de hidrólise enzimática das pastas *Kraft*

Atendendo a que a concentração de hidratos de carbonos presentes na pasta é de 100,00 g/L e tendo em conta o volume total da hidrólise, a massa de pasta seca (m_{seca}) a pesar correspondia 300,0g (Equação 5).

$$m_{\text{seca}}(\text{g}) = V_{\text{hidrólise}}(\text{L}) \times C_{\text{HC}}\left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right) = 3,0 \times 100,00 = 300,0\text{g} \quad \text{Equação 5}$$

No entanto, como se pode verificar pelos dados da Tabela 4, a pasta utilizada continha 72,00 % de humidade, por isso, a massa de pasta *Kraft* ($m_{\text{tal_qual}}$) pesada foi de 1071,4 g (Equação 6).

$$m_{\text{tal_qual}}(\text{g}) = \frac{m_{\text{seca}}(\text{g})}{1-H} = \frac{300,0}{1-0,72} = 1071,4 \text{ g} \quad \text{Equação 6}$$

Após a pesagem da pasta esta foi colocada num banho a 50 °C, tendo sido adicionado um volume de água de 2,029 L.

Inicialmente foi calculado o volume de amostra (V_{amostra}) correspondente à água, na forma de humidade, que se encontrava na pasta *Kraft* crua (Equação 7).

$$V_{\text{amostra}}(\text{mL}) = m_{\text{tal_qual}} - m_{\text{seca}} = 1071,4 - 300,0 = 771,4 \text{ mL} \quad \text{Equação 7}$$

O volume de água a adicionar à pasta *Kraft* crua de forma a perfazer os 3,0 L foi calculado tendo em conta a água que já existia na pasta e o volume de solução enzimática (V_{SE}) adicionada (Equação 8).

$$V_{\text{água}}(\text{L}) = V_{\text{hidrolisado}} - (V_{\text{amostra}} + V_{\text{SE}}) \times 10^{-3} = 3000 - (771,4 + 200,0) \times 10^{-3} = 2,029 \text{ L} \quad \text{Equação 8}$$

Posteriormente foi preparada uma solução enzimática que continha 58,5 mL (V_{E}) de preparado enzimático Novozymes NS, ao qual se adicionou água até perfazer 200,0 mL

Anexos

(V_{SE}). Para calcular o volume de preparado enzimático necessário para hidrolisar a pasta foi tida em conta a massa de hidratos de carbono presentes na pasta *Kraft* crua e a atividade enzimática da enzima a utilizar.

$$m_{HC}(g) = m_{seca}(g) \times \text{Orgânicos} = 300,0 \times 0,98 = 294,0 \text{ g} \quad \text{Equação 9}$$

$$\text{Carga enzimática (FPU)} = \text{Carga enzimática} \left(\frac{\text{FPU}}{\text{g}} \right) \times m_{HC}(g) = 20 \times 294,0 = 5880 \text{ FPU} \quad \text{Equação 10}$$

$$V_E(\text{mL}) = \frac{\text{Carga da enzima (FPU)}}{\text{Atividade enzimática} \left(\frac{\text{FPU}}{\text{mL}} \right)} = \frac{5880}{100,5} = 58,5 \text{ mL} \quad \text{Equação 11}$$

2. Realização da curva de calibração Concentração da biomassa (g/L) vs. Absorvância (660 nm)

Após o término das fermentações foram recolhidas quatro porções de igual volume de meio fermentado para tubos Falcon previamente pesados. O meio fermentado foi então sujeito a centrifugação de forma a ser obtida apenas a biomassa (X), que posteriormente foi lavada e colocada a 80 ° C (dentro do tubo Falcon) até ser obtido um peso constante. Na Tabela 13 encontram-se as massas referentes aos tubos Falcon, aos tubos Falcon contendo a biomassa e à biomassa, em gramas.

Tabela 13. Massas dos tubos Falcon, dos tubos Falcon com a biomassa (X) e da biomassa em cada réplica

Massa dos tubos Falcon (g)	Massa dos tubos Falcon + X (g)	X (g)
13,7282	13,7564	0,0282
13,7356	13,7649	0,0293
13,7997	13,8290	0,0293
13,7627	13,7916	0,0289

Através dos valores das massas de biomassa e sabendo o volume de meio fermentado colocado em cada tubo Falcon (50,00 mL), foi calculada a concentração de

biomassa em cada réplica e posteriormente calculada a média (Tabela 14).

$$[X] \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = \frac{\text{Massa de biomassa (g)}}{\text{Volume de meio fermentado (L)}}$$

Tabela 14. Concentração da biomassa (X) em cada uma das réplicas e respetivo valor médio

[X] (g/L)	[X] média (g/L)
0,564	0,582
0,586	
0,586	
0,578	

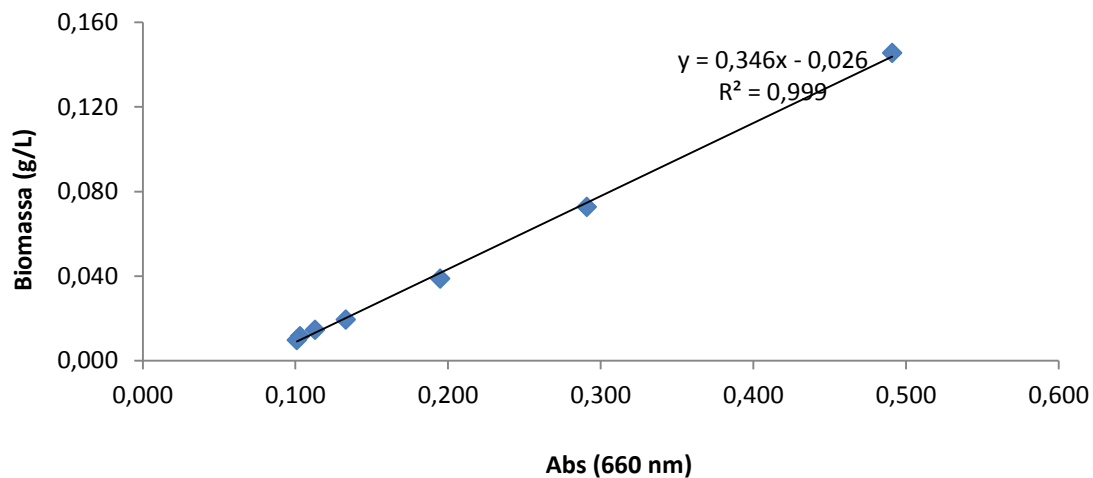
Utilizando o mesmo meio fermentado, foram realizadas várias diluições, das quais foram lidas as absorvâncias a 660 nm. O valor médio de concentração de biomassa obtido anteriormente (0,58 g/L) foi dividido pelo respetivo fator de diluição, conseguindo-se assim uma relação entre a absorvância a 660 nm e a biomassa (g/L) (Tabela 15).

Tabela 15. Relação entre a biomassa (g/L) e a Absorvância a 660 nm

Absorvância 660 nm	Fator de diluição	[Biomassa] (g/L)
0,806	2	0,29
0,491	4	0,15
0,291	8	0,073
0,195	15	0,039
0,133	30	0,019
0,113	40	0,015
0,103	50	0,012
0,101	60	0,010

A relação linear entre a concentração da biomassa (g/L) e a absorvância a 660 nm encontra-se na Figura 37.

Anexos



A curva de calibração deste ensaio é:

$$\text{Biomassa (g/L)} = 0,346 \times (\text{Absorvância (660 nm)}) - 0,026$$

Figura 37. Representação da relação linear entre a concentração de biomassa (g/L) e a absorvância a 660 nm

Assim, aplicando apenas esta equação aos valores de absorvância de cada ponto, é possível saber qual a concentração de biomassa ao longo das fermentações. É de salientar que este procedimento foi sempre realizado no fim de cada ensaio, sendo que era feita uma nova curva de calibração quando se alterava a concentração de açúcar no meio ou quando era utilizado hidrolisado.

3. Curvas de calibração referentes à análise de HPLC

Nas figuras seguintes encontram-se as curvas de calibração referentes à glucose, xilose, ácido succínico, ácido fórmico, ácido acético e ácido láctico e as respectivas equações.

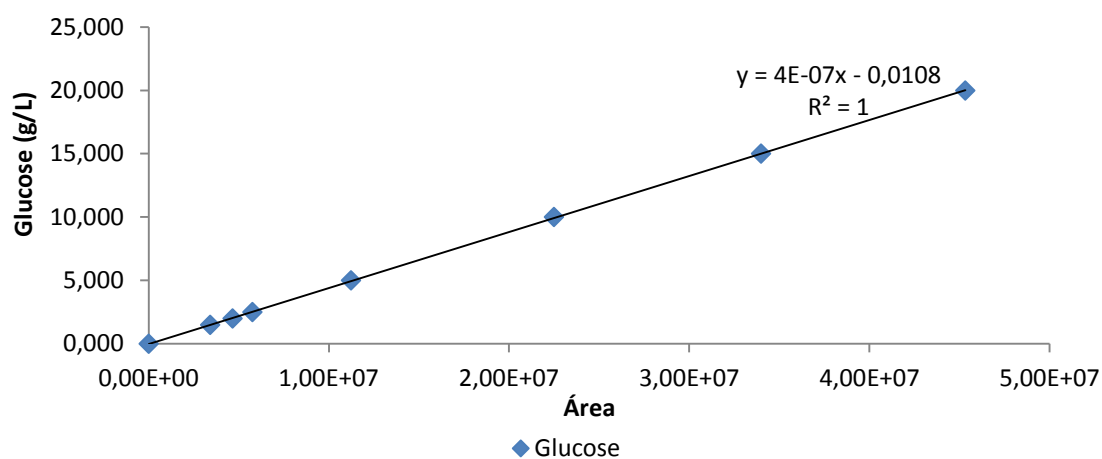


Figura 38. Curva de calibração Área vs. Glucose (g/L)

$$[\text{Glucose}] = 4 \times 10^{-7}(\text{Área}) - 0,0108$$

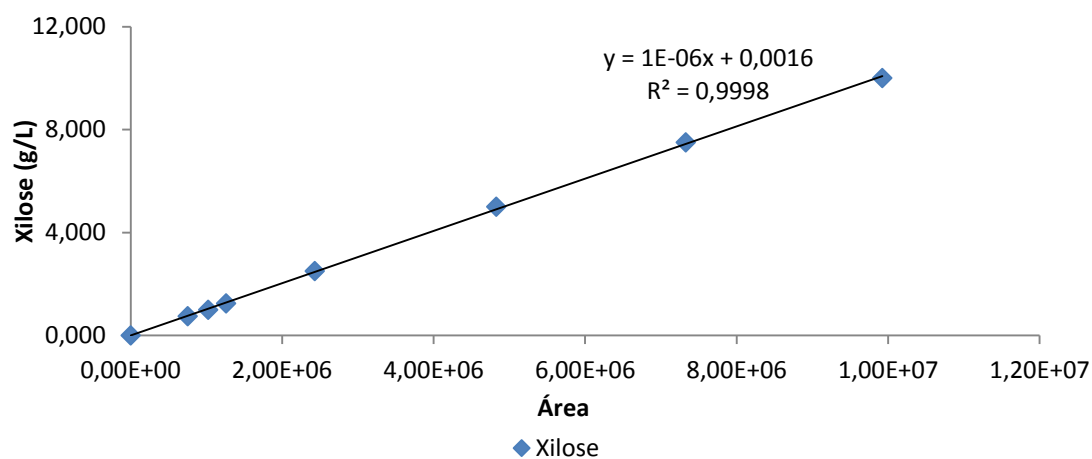


Figura 39. Curva de calibração Área vs. Xilose (g/L)

$$[\text{Xilose}] = 1 \times 10^{-6}(\text{Área}) - 0,0016$$

Anexos

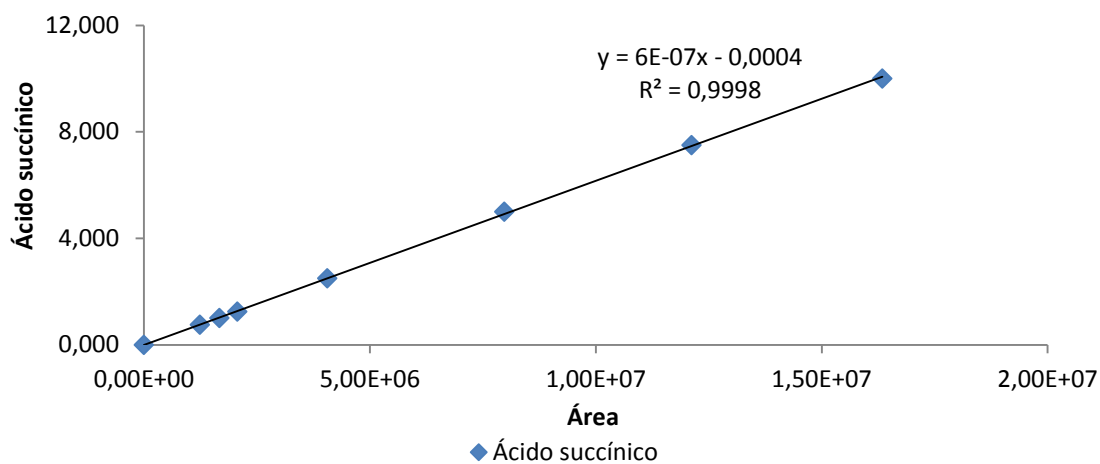


Figura 40. Curva de calibração Área vs. Ácido succínico (g/L)

$$[\text{Ácido succínico}] = 6 \times 10^{-7}(\text{Área}) - 0,0004$$

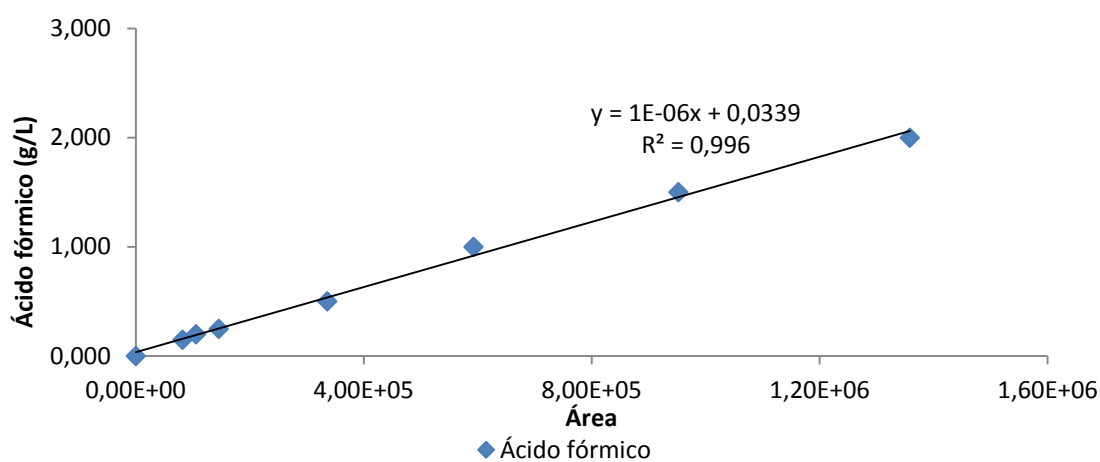


Figura 41. Curva de calibração Área vs. Ácido fórmico (g/L)

$$[\text{Ácido fórmico}] = 1 \times 10^{-6}(\text{Área}) - 0,0339$$

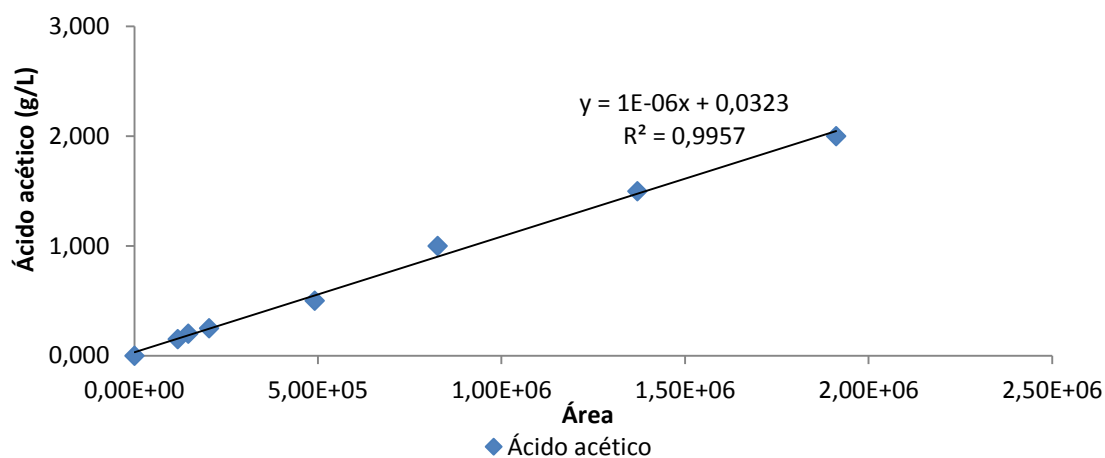


Figura 42. Curva de calibração Área vs. Ácido acético (g/L)

$$[\text{Ácido acético}] = 1 \times 10^{-6}(\text{Área}) - 0,0323$$

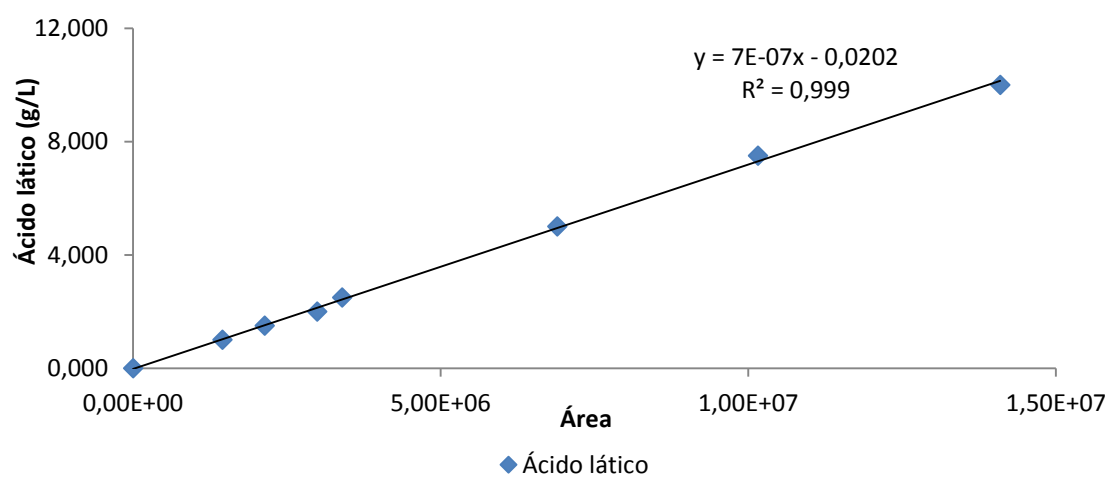


Figura 43. Curva de calibração Área vs. Ácido láctico (g/L)

$$[\text{Ácido láctico}] = 7 \times 10^{-7}(\text{Área}) - 0,0202$$